

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

SUELEN LUCIO BOSCHEN

**ESTUDO DOS EFEITOS DE INFUSÕES DE UM AGONISTA E UM ANTAGONISTA
DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2 NO NÚCLEO ACCUMBENS E
ESTRIADO DORSOLATERAL SOBRE O APRENDIZADO E PERFORMANCE DE
RATOS NA ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS**

CURITIBA
2011

SUELEN LUCIO BOSCHEN

**ESTUDO DOS EFEITOS DE INFUSÕES DE UM AGONISTA E UM ANTAGONISTA
DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2 NO NÚCLEO ACCUMBENS E
ESTRIADO DORSOLATERAL SOBRE O APRENDIZADO E PERFORMANCE DE
RATOS NA ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Da Cunha

CURITIBA
2011



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

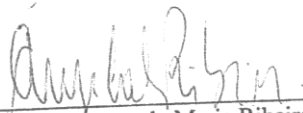


PARECER


A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "ESTUDO DOS EFEITOS DE INFUSÕES DE UM AGONISTA E UM ANTAGONISTA DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2 NO NÚCLEO ACCUMBENS E NO ESTRIADO DORSOLATERAL SOBRE O APRENDIZADO E PERFORMANCE DE RATOS NA ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS." de autoria da pós-graduanda: **SUELEN LÚCIO BOCHEN**, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha e composta pelos professores: Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Orientador- UFPR); Prof^ª. Dr^ª. Angela Maria Ribeiro (UFMG); Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia- UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Em Curitiba, 21 de fevereiro de 2011.



Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Orientador- UFPR)



Prof.ª Dr.ª Angela Maria Ribeiro (UFMG)



Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia- UFPR)

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1693 – Fax (41) 3266-2042 – pgfarmacologia@ufpr.br
<http://farmacologia.bio.ufpr.br/posgraduacao>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por colocar em meu caminho oportunidades com as quais pude alcançar meus objetivos e aprender com as dificuldades.

Agradeço ao meu marido, Luciano, por toda compreensão, incentivo, apoio e carinho concedido a mim, não só durante a execução deste projeto, mas desde o dia em que nos conhecemos. Esta força foi e continuará sendo muito importante. Te amo!

Agradeço imensamente aos meus pais, Ivo e Rogéria, que me acompanharam nesta caminhada e em todos os passos da minha vida. Muito obrigada por todo amor incondicional, confiança nas minhas decisões, carinho nas horas difíceis e por sempre me ensinarem a discernir entre o certo e o errado.

À minha querida irmã, Danielle, meu cunhado, Júnior, e minha linda afilhada, Anna Beatriz. Esta conquista também é de vocês!

Não posso deixar de prestar meus agradecimentos ao Prof. Dr. Cláudio da Cunha, meu orientador e amigo. Obrigada pelos ensinamentos, por me confiar este projeto e conduzir meus passos em direção ao sucesso. Obrigada também por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Dr. Philip Winn, pela valiosa colaboração científica.

Agradeço aos meus grandes amigos Evellyn e Edmar. Obrigada por terem me concedido a oportunidade que mudou minha vida. Tenho imensa admiração por vocês!

Aos colegas de laboratório que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução deste trabalho. Obrigada pela troca de conhecimentos, pelo apoio técnico, pelos conselhos profissionais e pessoais, pelas risadas, lanches, enfim, por fazerem deste o melhor trabalho do mundo.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia, Sílvia, Lindacir, Dolores, Patrícia e Ely, por todo esforço e dedicação concedidos aos alunos da pós-graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

***“Vá tão longe quanto possa ver.
Quando chegar lá, você poderá ver ainda mais longe.”***

-Thomas Carlyle

RESUMO

O papel da dopamina em ações motivadas pela recompensa está bem esclarecido, entretanto seu papel no aprendizado de como evitar eventos aversivos ainda é controverso. Testamos, neste estudo, o papel de receptores dopaminérgicos D2 no núcleo accumbens (NAc) e no estriado dorsolateral (DLS) de ratos no aprendizado e performance de respostas condicionadas de esquiva (CAR, do inglês *conditioned avoidance response*). Ratos Wistar machos adultos receberam administrações sistêmicas, intra-NAc ou intra-DLS (pré ou pós-treino) do agonista de receptores D2 (quimpirrole) ou do antagonista ((-)sulpiride) e foram submetidos a duas sessões da esquiva ativa de duas vias. Os principais efeitos observados foram: (i) sulpiride e quimpirrole nas doses pré-sinápticas (mais baixas) reduziram o número de CAR e aumentaram o número de falhas de fuga; (ii) doses pós-sinápticas de quimpirrole aumentaram o número de cruzamentos inter-tentativas e de falhas de fuga; (iii) a administração pré-treino de sulpiride reduziu o número de CAR nas sessões de treino e teste na infusão intra-NAc, efeito que foi observado somente na sessão de teste para infusão intra-DLS; (iv) a administração pós-treino de sulpiride reduziu o número de CAR na sessão teste quando infundido no NAc, mas não no DLS. Esses achados sugerem que a ativação de receptores D2 no NAc é crítica para a adaptação rápida da resposta ao estímulo aversivo condicionado e incondicionado enquanto a ativação desses receptores no DLS é necessária para o aprendizado lento de como responder a esses mesmos estímulos baseado em experiências prévias.

Palavras-chave: dopamina, receptores dopaminérgicos D2, núcleo accumbens, estriado dorsolateral, esquiva ativa de duas vias, quimpirrole, sulpiride.

ABSTRACT

The role of dopamine in rewarding motivated actions is well established, but its role in learning of how to avoid aversive events is still controversial. Here we tested the role of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens (NAc) and the dorsolateral striatum (DLS) of rats in learning and performance of conditioned avoidance responses (CAR). Adult male Wistar rats received systemic, intra-Nac or intra-DLS (pre- or post-training) administration of a D2 receptor agonist (quinpirole) or antagonist ((-)-sulpiride), and were given 2 sessions in the 2-way active avoidance task. The main effects observed were the following: (i) sulpiride and presynaptic (lower) doses of quinpirole decreased the number of CARs and increased the number of escape failures; (ii) Postsynaptic (higher) doses of quinpirole increased inter-trial crossings and failures; (iii) Pre-training administration of sulpiride decreased the number of CARs in both training and test sessions when infused into the Nac, but this effect was observed only in the test session when it infused into the DLS; (iv) Post-training administration of sulpiride decreased CARs in the test session when infused into the Nac, but not in the DLS. These findings suggest that activation of D2 receptors in the Nac is critical for a fast adaptation of the responding to unconditioned and conditioned aversive stimuli while activation of these receptors in the DLS is needed for a slow learning of how to respond to the same stimuli based on previous experiences.

Keywords: dopamine, D2 dopaminergic receptors, nucleus accumbens, dorsolateral striatum, two-way active avoidance, quinpirole, sulpiride.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Neuroanatomia dos núcleos da base.....	14
Figura 2 – Diagrama das principais conexões dos núcleos da base indicando as vias direta e indireta.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A-C – Associação Ação-Consequência (ação direcionada a um objetivo)
- ATV – Área tegmentar ventral
- CAR – Resposta condicionada de esquiva (do inglês, *Conditioned avoidance response*)
- CS – Estímulo condicionado (do inglês, *conditioned stimulus*)
- DAT – Proteína transportadora de dopamina (do inglês, *dopamine transporter*)
- DLS – Estriado dorsolateral (do inglês, *dorsolateral striatum*)
- DMS – Estriado dorsomedial (do inglês, *dorsomedial striatum*)
- DV – Dorso-ventral (do inglês, *Dorsoventral*)
- E-R – Associação Estímulo-Resposta
- E-R-C – Associação Estímulo-Resposta-Consequência
- GPe – Globo pálido externo
- GPI – Globo pálido interno
- i.p. – Intraperitoneal
- ITC – Cruzamento intertentativa (do inglês, *Inter-trial crossing*)
- LTD – Depressão de Longa Duração (do inglês, *Long-Term Depression*)
- LTP – Potenciação de Longa Duração (do inglês, *Long-Term Potentiation*)
- ML – Linha média (do inglês, *Midline*)
- MSN – Neurônios espinhosos médios (do inglês, *Medium Spiny Neurons*)
- NAc – Núcleo Accumbens
- SNC – Substância Negra *pars compacta*
- SNr – Substância Negra *pars reticulata*
- US – Estímulo incondicionado (do inglês, *Unconditioned Stimulus*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL	22
2.1	Objetivos específicos	22
3	ARTIGO CIENTÍFICO	23
4	DISCUSSÃO GERAL.....	52
5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta os resultados sob forma de artigo científico, no qual encontram-se descritos os itens Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências. Estes itens representam a íntegra deste trabalho.

Na dissertação, o item 4, Discussão Geral, apresenta comentários gerais a respeito dos resultados obtidos no artigo. No item 5, Conclusão, são apresentadas as conclusões gerais da dissertação. As Referências Bibliográficas, item 6, referem-se às citações que aparecem na Introdução e na Discussão Geral da dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença crônica e debilitante que afeta aproximadamente 1% da população mundial (Karam et al., 2010; Mikell et al., 2009). Pode ocorrer como uma doença esporádica ou hereditária, em que o surgimento dos primeiros sintomas ocorre, em geral, na adolescência ou no início da idade adulta, podendo evoluir para um quadro clínico de grande incapacidade (Karam et al., 2010). Os sintomas que a caracterizam estão agrupados em três domínios principais: sintomas positivos que incluem distúrbios de pensamento e percepção da realidade, como alucinações e delírios; sintomas negativos como isolamento social, falta de motivação e apatia; e os sintomas cognitivos representados por prejuízos de atenção, de memória e das funções executivas (Mikell et al., 2009; Simpson et al., 2010).

Há muito foi sugerido que disfunções dopaminérgicas seriam responsáveis pela patogênese da esquizofrenia (Heinz e Schlagenhauf, 2010; Howes e Kapur, 2009). Inicialmente, baseado em estudos dos efeitos de drogas antipsicóticas típicas, propôs-se que uma super-estimulação dos receptores dopaminérgicos poderia estar envolvida com a etiologia da doença. De fato, todas as drogas estabelecidas até o momento para o tratamento de esquizofrenia são antagonistas dos receptores dopaminérgicos da família D2 (Mikell et al., 2009; Simpson et al., 2010). Entretanto, a hipótese dopaminérgica original não considerou importantes distinções entre as vias dopaminérgicas (Simpson et al., 2010), responsáveis pela diferenciação sintomatológica da doença.

Existem quatro grandes vias dopaminérgicas. São elas: (i) via mesolímbica, com fibras partindo principalmente da área tegmentar ventral (ATV) para o estriado ventral, medial e outras estruturas do sistema límbico, como o hipocampo e a amígdala. (ii) A via mesocortical tem projeções da ATV para o córtex pré-frontal. Estas duas vias dopaminérgicas estão criticamente relacionadas com o processamento e regulação de estímulos emocionais e à flexibilidade comportamental. A via mesolímbica, em especial, é considerada como um sistema neural crítico para o processamento de informações com saliência motivacional, tais, como o consumo de drogas de abuso e estímulos apetitivos que funcionam como reforçadores naturais (Laviolette, 2007). Ainda há (iii) a via nigroestriatal, com fibras

nervosas projetando-se da substância negra *pars compacta* (SNc) para o estriado dorsal, e, finalmente, (iv) a via tuberoinfundibular que parte do hipotálamo para a hipófise anterior. A participação destas duas últimas vias na esquizofrenia está associada mais especificamente ao surgimento de reações adversas ao uso de drogas antipsicóticas típicas e atípicas. O bloqueio de receptores dopaminérgicos D2 nas vias nigroestriatal e tuberoinfundibular contribui, respectivamente, para o desenvolvimento de sintomas motores, como rigidez muscular, acinesia ou bradicinesia, ou acatisia e distonia, e de ginecomastia e galactorréa (Stahl, 2008).

A partir de novos estudos *post-mortem*, de neuroimagens e de manipulação das vias dopaminérgicas em animais de laboratório, surgiu a hipótese dopaminérgica modificada, segundo a qual, haveria além da hiperatividade da dopamina na via mesolímbica, importante para o surgimento dos sintomas positivos, uma redução da atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal que contribuiria para o surgimento dos sintomas cognitivos (Simpson et al., 2010) e negativos (Howes e Kapur, 2009). Porém, uma proposta mais recente mostra evidências de que ocorre, no curso inicial da doença, um aumento na concentração extrasináptica de dopamina estriatal e no número de receptores dopaminérgicos D2 estriatais. Esta hiperatividade dopaminérgica estriatal promove mudanças compensatórias tardias no córtex pré-frontal durante a progressão da doença e são mantidas mesmo após o tratamento com antipsicóticos (Simpson et al., 2010).

No centro das diversas manifestações sintomáticas da esquizofrenia há um distúrbio fundamental no processamento, percepção e regulação emocional. A apatia que acomete os pacientes esquizofrênicos pode ser caracterizada como uma falta de interesse ou de motivação por atividades pessoais e sociais e também por uma perda na capacidade de responder a eventos positivos e negativos (Van Reekum et al., 2005). Quando o cérebro não codifica adequadamente o valor emocional de um estímulo sensorial, há uma grande dificuldade em se elaborar comportamentos adaptativos motivados por estes estímulos (Laviolette, 2007).

Esses aspectos de aprendizagem inspirada por estados motivacionais dependem da ativação de sistemas de aprendizagem e memória específicos. Evidências comportamentais, anatômicas, psicológicas e neuroquímicas acumuladas ao longo dos anos apontam os núcleos da base como estruturas intimamente envolvidas com o processamento de informações motoras e cognitivas relacionadas aos estímulos ambientais, formando memórias de procedimento. A

expressão de memórias de procedimento pode ser concebida como um produto do processo de seleção de ações baseado em associações previamente formadas, como a associação de um estímulo neutro com um estímulo biologicamente relevante (condicionamento Pavloviano), ou a associação de um estímulo discreto com a consequência de uma ação específica (condicionamento instrumental).

Existem evidências de que os núcleos da base têm um papel importante na escolha de ações baseadas em estímulos condicionados e incondicionados. Os núcleos da base são formados pelo corpo estriado (núcleo caudado e putâmen em humanos), globo pálido (externo e interno), núcleo subtalâmico e substância negra (FIGURA 1) (Parent e Hazrati, 1995). Esses núcleos formam um circuito de interação com o córtex cerebral (circuito córtico-basal): os núcleos da base recebem informações do córtex e estruturas límbicas por projeções para o estriado e o núcleo subtalâmico que, através do globo pálido e substância negra *pars reticulata* (SNr), devolvem essas informações processadas ao córtex frontal, através de núcleos do tálamo (Alexander et al., 1986; Di Fillipo et al., 2009).

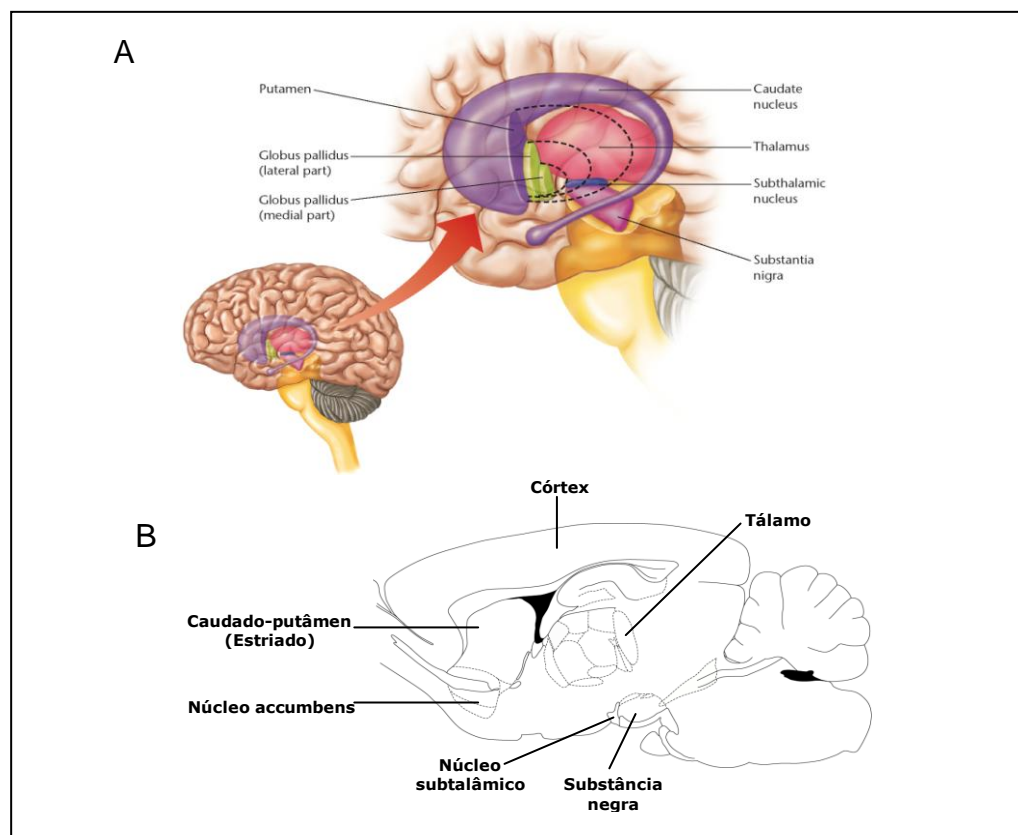


FIGURA 1 – Neuroanatomia dos núcleos da base: representação esquemática tridimensional em humanos (A) e em ratos (B).

FONTE: modificado de Redgrave et al. (2008).

Esse processamento é modulado por projeções dopaminérgicas da SNc e ATV para o estriado e outros componentes dos núcleos da base. Todo o repertório de ações do sujeito pode ser ativado pelos neurônios tálamo-corticais que fazem parte desse circuito. Esses neurônios estão sob inibição tônica dos neurônios do globo pálido e SNr. Essa inibição pode ser removida ou acentuada por neurônios estriatais GABAérgicos chamados de MSN (do inglês *Medium Spiny Neurons*). Esses neurônios formam duas vias: a chamada “via direta” porque projeta diretamente para os núcleos de saída do circuito córtico-basal, o segmento interno do globo pálido (GPi) e a SNr; e a chamada “via indireta” porque projeta indiretamente para o GPi e SNr (via globo pálido externo, GPe) (FIGURA 2). A ativação da via direta resulta na liberação da ação motora escolhida e a ativação da via indireta na finalização de uma ação ou na inibição de ações inapropriadas. (Alexander et al., 1986; Delong e Wichmann, 2007).

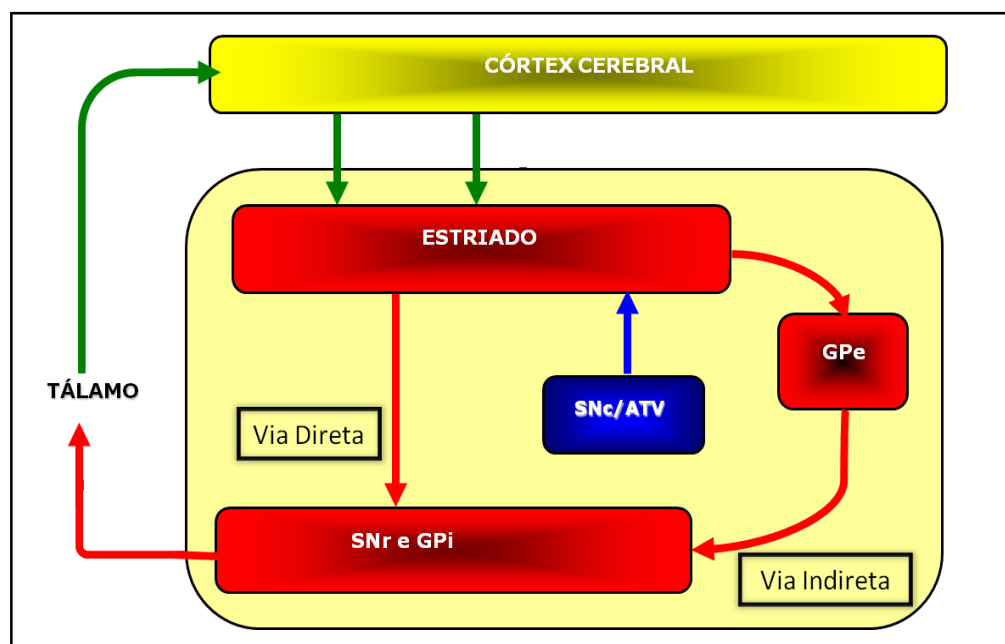


FIGURA 2 – Diagrama das principais conexões dos núcleos da base indicando as vias direta e indireta. As setas vermelhas indicam projeções GABAérgicas, setas verdes projeções glutamatérgicas, e seta azul projeções dopaminérgicas. Abreviações: ATV, área tegmentar ventral; GPe, globo pálido externo; GPi, Globo pálido interno; SNc, substância negra *pars compacta*; SNr, Substância negra *pars reticulata*.

FONTE: Adaptado de Alexander et al. (1986).

Na tentativa de explicar como ocorre a escolha de ações motoras no estriado, formulamos (Da Cunha et al., 2009), recentemente, um modelo chamado de Mosaico dos Espelhos Quebrados que propõe que o estriado codifica cada ação

específica como uma parte do corpo (dedo, mão, pé, etc) agindo sobre um objeto, ou o sujeito se deslocando para um local específico. Isso aconteceria porque os MSN recebem projeções convergentes de regiões corticais que representam esses elementos (Flaherty e Graybiel, 1991) e projetam (via globo pálido, SNr e tálamo) para áreas motoras do córtex frontal. Isso equivale a dizer que estímulos sensoriais produzidos por objetos ou partindo de locais específicos do ambiente podem ativar neurônios estriatais que codificam ações motoras, como movimentos dos braços, olhos, ou outras partes do corpo em direção a um alvo específico (objeto ou região do ambiente).

O circuito córtico-basal também desempenha um papel importante no aprendizado de como escolher as ações certas para o momento certo. Esse aprendizado depende de alterações na força das sinapses entre os neurônios corticoestriatais e os MSN no estriado (Calabresi et al., 2007). É o fortalecimento dessas sinapses que forma os traços de memória que aumentam a probabilidade de que uma resposta específica seja determinada por estímulos ambientais incondicionados (aqueles biologicamente relevantes – que produzem respostas emocionais inatas, p.ex. estímulos dolorosos, apetitivos, sexuais, etc), por um estímulo condicionado (a visão ou o som de um objeto, um ambiente específico) ou por um objetivo.

Os mecanismos responsáveis pela formação dos traços de memória no estriado são os fenômenos de plasticidade sináptica chamados potenciação de longa duração (LTP, do inglês *Long-term Potentiation*) e depressão de longa duração (LTD, do inglês *Long-term Depression*). De acordo com a lei de Hebb, ocorre LTP quando neurônios pré- e pós-sinápticos estão simultaneamente despolarizados (Squire e Kandel, 2003). Dessa maneira, a associação entre os estímulos sensoriais e motores, provenientes dos córtices somatossensorial e motor, respectivamente, é adquirida quando a LTP é induzida nas sinapses de ambos os neurônios corticoestriatais com o mesmo MSN no momento em que os três neurônios estão despolarizados ao mesmo tempo. Por exemplo, para aprender a ação de digitar a letra U no teclado do computador com o dedo indicador direito, o neurônio cortical que representa esse dedo, o neurônio que representa a “tecla U” e o MSN para o qual eles projetam devem estar ativos ao mesmo tempo. Isso leva ao fortalecimento das sinapses entre esses neurônios de forma que a visão da “tecla U” aumenta a probabilidade de que o MSN que libera essa ação seja ativado.

A função da dopamina em todo este processo de plasticidade sináptica é promover a modulação da mesma, ou seja, aumentar a probabilidade de que o MSN certo seja ativado ao mesmo tempo que o neurônio cortical. Isso corresponde a “imprimir um sinal de aprendizado”, ou seja, avisar quando o aprendizado de uma ação deve ocorrer. Isso ocorre quando a dopamina é liberada no estriado de forma fásica. O disparo fásico dos neurônios dopaminérgicos leva a uma liberação robusta e transitória desse neurotransmissor, cuja função, neste caso, é servir como um sinal de que há algo novo e relevante a ser aprendido (Schultz, 2007). Quando isso acontece, a dopamina fásica promove a LTP na via direta e a LTD na via indireta (Calabresi et al., 2007). Com isso, diante do mesmo estímulo, a probabilidade de que aquela ação escolhida seja iniciada aumenta porque ela é promovida pela estimulação da via direta (que foi fortalecida) e pela inibição da via indireta (que foi enfraquecida para essa ação) (Di Filippo et al., 2009).

Estudos de Schultz (2007) sugerem que a liberação fásica de dopamina ocorre em resposta a um estímulo condicionado (gratificante) imprevisível, sendo a quantidade de dopamina liberada proporcional à diferença entre a recompensa esperada e a recompensa obtida. É o chamado “erro de predição”. Segundo esta teoria, neurônios dopaminérgicos da ATV e SNc disparam fasicamente com aumento da concentração extrasináptica de dopamina em resposta a estímulos apetitivos, enquanto estes mesmos neurônios sofrem uma inibição da liberação tônica de dopamina frente a estímulos aversivos (Schultz, 2007). Há também evidências recentes de que outra população de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos responde de forma semelhante para estímulos aversivos (Brischoux et al., 2009; Matsumoto e Hikosaka, 2009). No estudo de Matsumoto e Hikosaka (2009), eles fizeram registros de célula isolada em neurônios dopaminérgicos de macacos durante uma tarefa de condicionamento Pavloviano em que recebiam estímulos incondicionados apetitivo (suco de maçã) e aversivo (sopro de ar). Foi observado que, além dos neurônios dopaminérgicos que dispararam fasicamente com a apresentação do estímulo apetitivo e foram inibidos pelo estímulo aversivo, havia outra população de neurônios que liberavam dopamina fasicamente frente à apresentação de ambos os estímulos apetitivo e aversivo (Matsumoto e Hikosaka, 2009).

Além do efeito da dopamina fásica sobre a aprendizagem, uma pequena quantidade de dopamina é liberada de forma tônica e é necessária para a escolha

das ações previamente reforçadas pela liberação fásica de dopamina (Grace e Bunney, 1984a; Grace e Bunney, 1984b; Zhang et al., 2009). Isso acontece porque agindo sobre receptores da família D1, a dopamina tônica excita os MSN que estão prestes a se despolarizar (porque suas sinapses com os neurônios corticais que representam certos estímulos ambientais foram previamente reforçadas) e inibe os que estão com potencial de membrana mais negativo (porque não foram reforçados previamente). Os receptores D2 pré-sinápticos têm um efeito semelhante na liberação de glutamato pelos neurônios córtico-estriatais: ao promover a inibição da liberação desse neurotransmissor pelos terminais glutamatérgicos que estão pouco ativos (Hooper et al., 1997). Esse mecanismo faz com que a dopamina tônica exerça um papel de filtro sinal-ruído, aumentando a probabilidade de que a ação certa (aprendida) seja iniciada na hora certa (quando sinalizada por certos estímulos ambientais condicionados e incondicionados).

Tal como mencionado acima, os receptores dopaminérgicos estão classificados em duas famílias: tipo-D1 e tipo-D2. A família D1 inclui os receptores D1 e D5, acoplados à proteína Gs, que, por aumentar os níveis intracelulares de AMPc culmina com o fechamento de canais de potássio (K^+), facilitando a despolarização celular. Já a família D2 engloba os receptores D2 (incluindo as isoformas curta e longa – D2S e D2L), D3 e D4, acoplados à proteína Gi, que, por sua vez, inibe a enzima adenilato ciclase, diminui a concentração de AMPc intracelular, promovendo a abertura de canais de K^+ no neurônio pós-sináptico e o fechamento de canais de cálcio (Ca^{2+}) no neurônio pré-sináptico, resultando na hiperpolarização das células (Missale et al., 1998). No estriado podem ser encontrados os receptores D1, D2 e D3, sendo os receptores D2 localizados tanto na pós-sinapse de MSN quanto na pré-sinapse de neurônios glutamatérgicos corticoestriatais e de neurônios dopaminérgicos, funcionando, no último caso, como autoreguladores inibitórios (Hooper et al., 1997; Missale et al., 1998). Os receptores tipo D1 estão localizados principalmente nos MSN da “via direta” e os receptores tipo D2 são expressos em neurônios da “via indireta” deste circuito. Um balanço fino da atividade das vias direta e indireta é essencial para o funcionamento normal dos núcleos da base.

Nesse sentido, receptores dopaminérgicos D2 são importantes para impedir que ações irrelevantes ou inadequadas para um determinado momento sejam iniciadas, bem como frear/finalizar ações já iniciadas. Dessa forma, dependendo do

local de atuação e da forma como estão regulados, os receptores dopaminérgicos D2 poderiam melhorar ou prejudicar a escolha de ações importantes para promover adaptações ao ambiente.

Na esquizofrenia, muitas vezes, o paciente perde esta capacidade de controlar o início ou a finalização de ações inadequadas, assim como de responder a dicas ambientais de que uma determinada ação pode ter uma consequência. Um mecanismo importante é a esQUIVA ativa condicionada, que é a capacidade de perceber (por uma dica ambiental) que um evento aversivo é iminente e com isso evitá-lo por uma ação específica. Esse déficit contribui para o quadro de apatia que é característico de pacientes esquizofrênicos mesmo em tratamento com antipsicóticos antagonistas de receptores D2 (Van Reekum et al., 2005; Laviolette, 2007). Essa propriedade farmacológica dos antipsicóticos tem sido usada pela indústria farmacêutica para o *screening* de novos antipsicóticos. Um dos modelos animais utilizados para esse *screening* é a esQUIVA ativa de duas vias (Wadenberg, 2010; Wadenberg e Hicks, 1999). A aprendizagem da esQUIVA ativa de duas vias envolve os condicionamentos Pavloviano e instrumental. Nessa tarefa, o animal deve emitir uma resposta condicionada de esQUIVA ou antecipar uma resposta de fuga sob a apresentação de um estímulo condicionado (CS, do inglês *conditioned stimulus*), que pode ser um sinal auditivo ou visual. Esse estímulo é sempre pareado a um estímulo incondicionado (US, do inglês *unconditioned stimulus*), um choque elétrico de baixa intensidade nas patas. Quando a resposta ao CS não é emitida no tempo estipulado, o US é então aplicado. Quando a resposta adequada ao CS é emitida, tanto o CS quanto o US são finalizados. O animal aprende a associar o CS ao US e assim ter medo condicionado do US (condicionamento Pavloviano); e a emitir uma resposta instrumental (cruzar para o outro lado da caixa de esQUIVA) para fugir do choque ou antecipar essa ação tão logo seja alertado pelo CS, para se esQUIVAR do choque (condicionamento instrumental) (Wadenberg e Hicks, 1999).

Em muitas situações os animais podem antecipar a iminência da apresentação de um estímulo reforçador ou aversivo (US) associando-o a um estímulo neutro que o precede (CS). Este tipo de aprendizagem é chamado de condicionamento clássico ou pavloviano, em homenagem ao pesquisador russo que o descreveu (Pavlov, 1927; Schultz, 2006), e não envolve necessariamente um processo consciente de aprendizado.

Muitos psicólogos contemporâneos discriminam os comportamentos resultantes do aprendizado instrumental em ações direcionadas a um objetivo (também chamadas de Ação-Consequência, A-C) e hábitos estímulo-resposta (E-R) (Balleine et al., 2009; Horvitz, 2009; Yin e Knowlton, 2006). O comportamento A-C é controlado por sua consequência. Os estímulos que quando apresentados de forma contingente a uma resposta, aumentam sua frequência são chamados de reforçadores positivos, enquanto aqueles que diminuem sua frequência são chamados de punidores. Nas situações de reforço negativo, a remoção de um estímulo aversivo na contingência de uma resposta resulta no aumento de sua frequência (Domjan e Burkhard, 1982; Eichenbaum, 2008). Por outro lado, em situações onde as consequências de uma resposta a um estímulo não influenciam a repetição ou extinção desta resposta, a repetição do pareamento do estímulo-resposta-consequência (E-R-C) leva a uma automação da resposta, de forma que o indivíduo a escolhe e executa de forma inconsciente (Yin e Knowlton, 2006). Os aspectos chave relacionados ao comportamento A-C envolvem (i) a flexibilidade do aprendizado que deve ser rápido para permitir a avaliação da consequência, sendo, (ii) o comportamento moldado de acordo com o valor da mesma e (iii) disponível aos mecanismos da consciência (Balleine e O'doherty, 2009). Os hábitos E-R envolvem, por sua vez: (i) um aprendizado lento, com (ii) pouca flexibilidade comportamental (exceto sob condições de extinção), e (iii) indisponível aos mecanismos da consciência (Wise, 1996).

Nos modelos atuais de envolvimento dos núcleos da base no condicionamento Pavloviano e instrumental (aprendizado de escolha de uma ação que resulte em reforço), tanto o estriado dorsal quanto o NAc fazem o mesmo tipo de computação, diferindo mais no padrão de conexões de seus *inputs* corticais e subcorticais. Segundo Balleine e O'Doherty (2009), o papel central do NAc parece estar relacionado com a tradução do valor hedônico do US e do CS (condicionamento Pavloviano) na motivação para a escolha de uma ação (condicionamento instrumental). Esse autor diferencia a escolha da ação por um processo automático (responder ao CS porque se formou um traço de memória de hábito entre o estímulo (CS) e a resposta (esquiva)) da escolha consciente (em humanos) de uma ação frente a um objetivo definido (evitar o choque) ou seja, devido à consequência da ação. Devido às conexões do estriado com regiões que codificam o valor hedônico da consequência (NAc), objetivos (DMS), estímulos

ambientais e respostas (DLS), atribui-se o condicionamento instrumental de uma aprendizagem rápida e flexível da ação direcionada a um objetivo ao NAc e DMS e o condicionamento instrumental que leva à lenta formação de hábitos E-R ao DLS (Balleine e O'doherty, 2009). Essa hipótese foi extensivamente corroborada por estudos com ratos com lesões no DLS e submetidos a um extenso condicionamento instrumental em uma caixa de Skinner. Tais estudos mostraram que essas lesões no DLS impediram a automação do comportamento que permaneceu sensível à desvalorização do reforço, ou seja, da consequência (Yin e Knowlton, 2006). A participação destas estruturas nestes tipos de aprendizados está bem esclarecida na literatura para tarefas que envolvem consequências positivas. Entretanto, tarefas de conteúdo aversivo, como a esquiva ativa de duas vias, ainda carecem de estudos que observem o papel exato dessas estruturas. A isso, combinamos no nosso trabalho a investigação do efeito de um agonista e um antagonista dopaminérgico, para testar se a aprendizagem de respostas condicionadas de esquiva é afetada pela administração de drogas que atuam em receptores D2 presentes nessas estruturas, modelando um tipo de apatia observada em pacientes esquizofrênicos sob tratamento com antipsicóticos que atuam como antagonistas D2.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel dos receptores dopaminérgicos D2 no NAc e DLS de ratos na aprendizagem, memória e desempenho de respostas condicionadas de esquiva.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar se a administração sistêmica de um agonista ou de um antagonista de receptores dopaminérgicos D2 pode prejudicar a aquisição ou a consolidação da tarefa de esquiva ativa de duas vias.
- Verificar o papel de receptores D2 do NAc sobre a aquisição e a consolidação da tarefa de esquiva ativa de duas vias.
- Verificar o papel de receptores D2 do DLS sobre a aquisição e a consolidação da tarefa de esquiva ativa de duas vias.
- Avaliar se o NAc poderia promover um aprendizado rápido da tarefa de esquiva ativa de duas vias.
- Avaliar se o DLS poderia promover um aprendizado lento da tarefa de esquiva ativa de duas vias.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

A ausência de respostas a estímulos ambientais biologicamente relevantes caracteriza um quadro de apatia apresentado por muitos pacientes esquizofrênicos. O motivo pelo qual os pacientes permanecem apáticos mesmo após o tratamento com antipsicóticos, que são, em sua maioria, antagonistas de receptores dopaminérgicos D2, ainda é desconhecido. A esquiva ativa de duas vias é um modelo animal muito utilizado no *screening* de drogas com potencial efeito antipsicótico. Nesta tarefa o animal deve aprender a emitir uma resposta motora adequada para evitar ou interromper a apresentação de um estímulo aversivo. Apesar dos mecanismos não serem totalmente esclarecidos, sabe-se que a dopamina participa da formação de memórias que envolvem a associação entre estímulos ambientais e escolha das respostas motoras corretas através da modulação da plasticidade córtico-estriatal, tanto no estriado dorsal quanto no NAc. Sugere-se que o NAc e o DLS participem da formação destas memórias, desempenhando papéis distintos, através da ativação ou do bloqueio de receptores dopaminérgicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de drogas dopaminérgicas seletivas para os receptores D2, administradas via intraperitoneal, intra-DLS e intra-NAc, no aprendizado, memória e desempenho da esquiva ativa de duas vias.

**The role of nucleus accumbens and dorsolateral striatal D2 receptors in
avoidance conditioning**

Trabalho submetido para
publicação na revista
Neurobiology of Learning
and Memory, 2011.

The role of nucleus accumbens and dorsolateral striatal D2 receptors in avoidance conditioning

Suelen Lucio Boschen ^a, Evellyn Claudia Wietzikoski ^{a, b}, Philip Winn ^c, and Claudio Da Cunha ^a

^aUniversidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil; ^bUniversidade Paranaense, UNIPAR, Francisco Beltrão, Brazil; ^cUniversity of Strathclyde, Glasgow, Scotland.

Address correspondence to Claudio Da Cunha, Ph.D., Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Departamento de Farmacologia, UFPR, C.P. 19.031, 81.531-980 Curitiba PR, Brazil. Tel: +55 41 3361-1717. Fax: +55 41 3266-2042. E-mail: dacunha@ufpr.br

Abstract

Background: The role of dopamine in rewarding motivated actions is well established but its role in learning of how to avoid aversive events is still controversial. Here we tested the role of D2-like dopamine receptors in the nucleus accumbens (NAc) and the dorsolateral striatum (DLS) of rats in learning and performance of conditioned avoidance responses (CAR).

Methods: Adult male Wistar rats received systemic, intra-NAc or intra-DLS (pre- or post-training) administration of a D2-like receptor agonist (quinpirole) or antagonist ((-)-sulpiride) and were given 2 sessions in the 2-way active avoidance task.

Results: The main effects observed were: (i) sulpiride and lower (likely presynaptic) doses of quinpirole decreased the number of CARs and increased the number of escape failures; (ii) Higher doses of quinpirole (likely postsynaptic) increased inter-trial crossings and failures; (iii) Pre-training administration of sulpiride decreased the number of CARs in both training and test sessions when infused into the NAc, but this effect was observed only in the test session when it was infused into the DLS; (iv) Post-training administration of sulpiride decreased CARs in the test session when infused into the NAc but not DLS.

Conclusions: These findings suggest that activation of D2 receptors in the NAc is critical for fast adaptation of responding to unconditioned and conditioned aversive stimuli while activation of these receptors in the DLS is needed for a slower learning of how to respond to the same stimuli based on previous experiences.

Keywords: *D2 dopaminergic receptor; goal-directed actions, habits, antipsychotics, schizophrenia.*

Introduction

D2 receptor antagonists efficiently treat the positive symptoms of schizophrenia (such as hallucinations and delusions) but are less effective against or even worsen the negative and cognitive symptoms (1). This includes loss of avoidance responding to warning stimuli, which makes patients apathetic even to warnings of imminent aversive events that could be avoided by simple actions. There is compelling evidence that cortical neurons which encode warning stimuli project to striatal neurons that trigger specific actions (2-5) and that phasic release of dopamine (DA) in the striatum strengthens the synaptic connections between these neurons (6). This increases the likelihood of an action occurring in response to a specific warning stimulus and can be considered as a memory trace for the conditioned avoidance response (CAR) (4).

Activation of DA D2-like receptors is critical for some kinds of synaptic plasticity in the striatum (7). In addition, activation of D2 receptors can inhibit the firing of those striatal neurons that prevent the onset of actions, including both avoidance actions and actions that are irrelevant or concurrent to an avoidance response. This is caused by activation of postsynaptic D2 receptors expressed in the striatal neurons of the so-called indirect pathway (8). D2 receptors are also expressed in presynaptic terminals in the striatum that, when activated, inhibit release of glutamate and DA from nerve terminals (9, 10). Therefore, depending on which class of D2 receptors is activated, it might improve or impair CAR learning and performance. This is further complicated by evidence that DA receptors expressed in different regions of the striatum play different roles in learning and performance of conditioned actions – though this is better established for appetitively motivated learning (11-13).

Avoidance is a form of instrumental behaviour that prevents an aversive event. CAR involves Pavlovian and instrumental conditioning (14) and can be performed either in goal-directed or habitual manners. A response is considered to be goal-directed when its frequency is affected by the outcome, and is considered to be habitual when it is automatically triggered by a conditioned stimulus (CS). In addition, goal-directed actions are learnt and extinguish more quickly than S-R habits (15). The dorsolateral striatum (DLS) is needed for learning stimulus-response (S-R) habits (16, 17) while the nucleus accumbens (NAc) is needed for both learning about

and the expression of certain forms of Pavlovian conditioning (11, 12, 18) – it contributes to the motivational control of instrumental performance and is important for maintenance of goal-directed actions (17, 19).

Though a CAR deficit is common to all antipsychotic drugs (14), the only study that has addressed the roles of the NAc and DLS on it (20) did not focus on CAR learning, but performance. This is the aim of the present study: we hypothesize that, whereas NAc D2 receptors play a role in CAR learning when it occurs quickly (as in learning of goal-directed actions), DLS D2 receptors play a role in CAR learning when it occurs slowly (as in S-R habit learning). These hypotheses were tested in rats that received the infusion of D2 receptor agonists and antagonists directly into these brain structures and were given two sessions of 2-way active avoidance, the rat model of CAR most often used to test antipsychotic drugs (14).

Methods and Materials

Subjects

Two hundred thirty four adult male Wistar rats from our own breeding stock, weighing 280-310g at the beginning of the experiments were used. The rats were maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12-h light/dark cycle (lights on, 7:00 a.m.) with water and food available *ad libitum*. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering in the experimental procedures. These procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Federal do Parana (protocol number 440) and are consistent with international legislation (EC Council Directive, 24 November 1986; 86/609/EEC). The number of rats per group is indicated in the Figure legends.

Surgery

Seven days before the start of behavioural experiments, rats received atropine sulfate (0.4 mg/kg, i.p.) and penicillin G-procaine (20,000U in 0.1 mL, i.m.) and were anesthetized with 3 mL/kg equithesin (1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, and 3.7% ethanol in water). Stainless-steel guide cannulae (1 cm long, 23 ga) were implanted bilaterally, aimed 2 mm above the DLS or NAc, according to the following coordinates adapted from the atlas of Paxinos and Watson (21): DLS: AP 0.0 mm from bregma; ML ± 3.8

mm from midline; DV -2.8 mm from skull surface; NAc: AP +1.7 mm from bregma; ML \pm 1.6 mm from midline; DV -5.2 mm from skull surface. The cannulae were fixed with polyacrylic cement anchored to the skull with stainless-steel screws. After surgery, rats were allowed to recover from anesthesia in a temperature controlled chamber and then placed back in their cages.

Drugs

Quinpirole and (-)-sulpiride (both Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 1 mL/kg body weight acidified saline (0.9% NaCl) for i.p. injections and in 0.4 μ L/side acidified artificial cerebrospinal fluid (aCSF: 8.66 g NaCl, 0.205 mg KCl, 0.176 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.173 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1 l water) for intra-NAc and intra-DLS injections (the pH were adjusted to 7.4 after the drugs were dissolved). Pre-training drug doses were chosen based on previous studies showing that, at the chosen doses, they produce reliable behavioural effects (10, 20, 22-24). Later we selected the most effective doses for post-training treatments. The i.p. administrations were given 20 min before or immediately after the training session; intra-NAc and intra-DLS administrations were given immediately before or immediately after the training session. Intra-cranial administration was made bilaterally through a pair of 30-gauge needles extending 2 mm beyond the tips of the implanted guide cannulae. They were gently inserted into each cannula while the rats were held. The injector was connected by polyethylene tubing to a 10 μ L Hamilton syringe mounted in an automatic microinfusion pump (Insight Instruments, Ribeirao Preto, Brazil) and the drug solution was injected over 30 s. The needles were retained in place for an additional minute. Sham animals received aCSF instead of drug solution.

Two-way active avoidance

The test apparatus was an automated 23x50x23 cm shuttle-box (Insight Instruments, Ribeirao Preto, Brazil) with a front made of Plexiglas and a floor made of parallel 5 mm caliber stainless-steel bars, 15 mm apart. The box was divided into 2 same size compartments by a wall with a door that remained open during the tests. The animals were given training and test sessions, carried out 24 h apart. In each session, after 10 min (training) or 5 min (test) of habituation, 40 light cues (maximum duration of 20 s) were paired with a subsequent 0.4 mA footshock (maximum

duration of 10 s, starting 10 s after the CS onset) until the animal crossed to the other compartment. The light cue consisted in the turning on of two 30 W light bulbs that were centered on each side of the rear of the chambers. The rat could turn off the light and avoid footshock by crossing to the other chamber during the presentation of the CS. If the rat did not avoid the shock by moving in advance of onset, it could still escape by crossing to the other chamber. The time between each trial varied randomly, ranging from 10 to 50 s. The numbers of active avoidances, escape failures, and inter-trial crossings (ITC) between the 2 box compartments were recorded automatically.

Histology

At the end of the experimental procedures, all rats were killed with an overdose of pentobarbital. To check for cannulae placement, rats were transcardially perfused with saline solution, followed by 4% paraformaldehyde; the brains were immediately post-fixed in the same fixative containing 20% sucrose for 48 h before sectioning. The brains were then cut in the frontal plane in 40 μ m thick sections with a vibrating blade microtome (Leica, VT1000 S, Bensheim, Germany). The sections were mounted on gelatin-coated slides and stained with thionin.

Statistical analysis

The number of avoidances, escape failures, and ITC were analyzed by two-way ANOVA with repeated measures (session) followed by the post hoc Newman-Keuls tests. Data of all rats that received pre-training drug treatments were analyzed. However, 4 rats submitted to the post-training treatments were excluded according to the following criterion: scoring less than 10 CARs or more than 10 escape failures in the training session. This procedure aimed to guarantee that the rats included had really learnt the task, a condition needed to test post-training effects of the drugs on memory consolidation. Latencies to respond to the first footshock presentation were analyzed by one-way ANOVA. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of Systemic Administration of Quinpirole and Sulpiride on Two-way Active Avoidance

The pre-training treatments' effects are shown in Figure 1A. A two-way ANOVA showed the following effects: (i) Number of avoidances: significant group [$F(6,65) = 3.41$; $p < 0.01$] and session [$F(1,65) = 244.88$; $p < 0.001$] effects, and a significant group by session interaction [$F(6,65) = 12.40$; $p < 0.001$]; (ii) Number of escape failures: significant group [$F(6,65) = 2.68$; $p < 0.05$] and session [$F(1,65) = 12.19$; $p < 0.001$] effects, and a significant interaction [$F(6,65) = 3.62$; $p < 0.005$]; (iii) Number of ITC: significant group [$F(6,65) = 3.05$; $p < 0.05$], and session [$F(1,65) = 6.85$; $p < 0.05$] effects and a significant interaction [$F(6,65) = 6.23$; $p < 0.001$]. The post-hoc analysis showed that the pre-training administration of 0.05 and 0.1 mg/kg quinpirole – doses reported to act presynaptically (23) – caused a significant reduction in the number of CARs in both training and test sessions. The idea that these are pre-synaptic effects is supported by the finding that 0.1 mg/kg quinpirole also caused a significant increase in the number of escape failures. On the other hand, the same effect was not observed with 1 mg/kg quinpirole, a dose that significantly increased locomotor activity (ITC) in the training session, probably because it acted on postsynaptic receptors (23). The pre-training administration of 1-100 mg/kg sulpiride caused a dose-dependent and significant reduction in the number of avoidances in the training session, but only the higher dose caused a significant reduction in the number of avoidances in the test session. This higher dose of sulpiride also caused a significant increase in the number of escape failures.

The post-training treatments' effects are shown in Figure 1B. Two-way ANOVA showed the following effects: (i) Number of avoidances: no significant group effect [$F(2,25) = 1.16$; $p = 0.33$], significant session effect [$F(1,25) = 6.72$; $p < 0.05$], and a significant group by session interaction [$F(2,25) = 4.26$; $p < 0.05$]; (ii) Number of escape failures: no significant group [$F(2,25) = 0.73$; $p = 0.49$] or session [$F(1,25) = 0.19$; $p = 0.67$] effects, and no significant interaction [$F(2,25) = 1.04$; $p = 0.37$]; (iii) Number of ITC: no significant group effect [$F(2,25) = 0.13$; $p = 0.88$], significant session effect [$F(1,25) = 5.40$; $p < 0.05$], and no significant interaction [$F(2,25) = 1.73$; $p = 0.20$]. Post-hoc analysis showed that post-training administration of

quinpirole and sulpiride caused a significant reduction in the number of CARs in the test session, without affecting the number of escape failures and ITC.

Similar conclusions were taken from analysis of the number of avoidance responses scored in blocks of 10 trials (Fig. S1) and latencies to respond to the US and CS in the first day of training (Fig. S2).

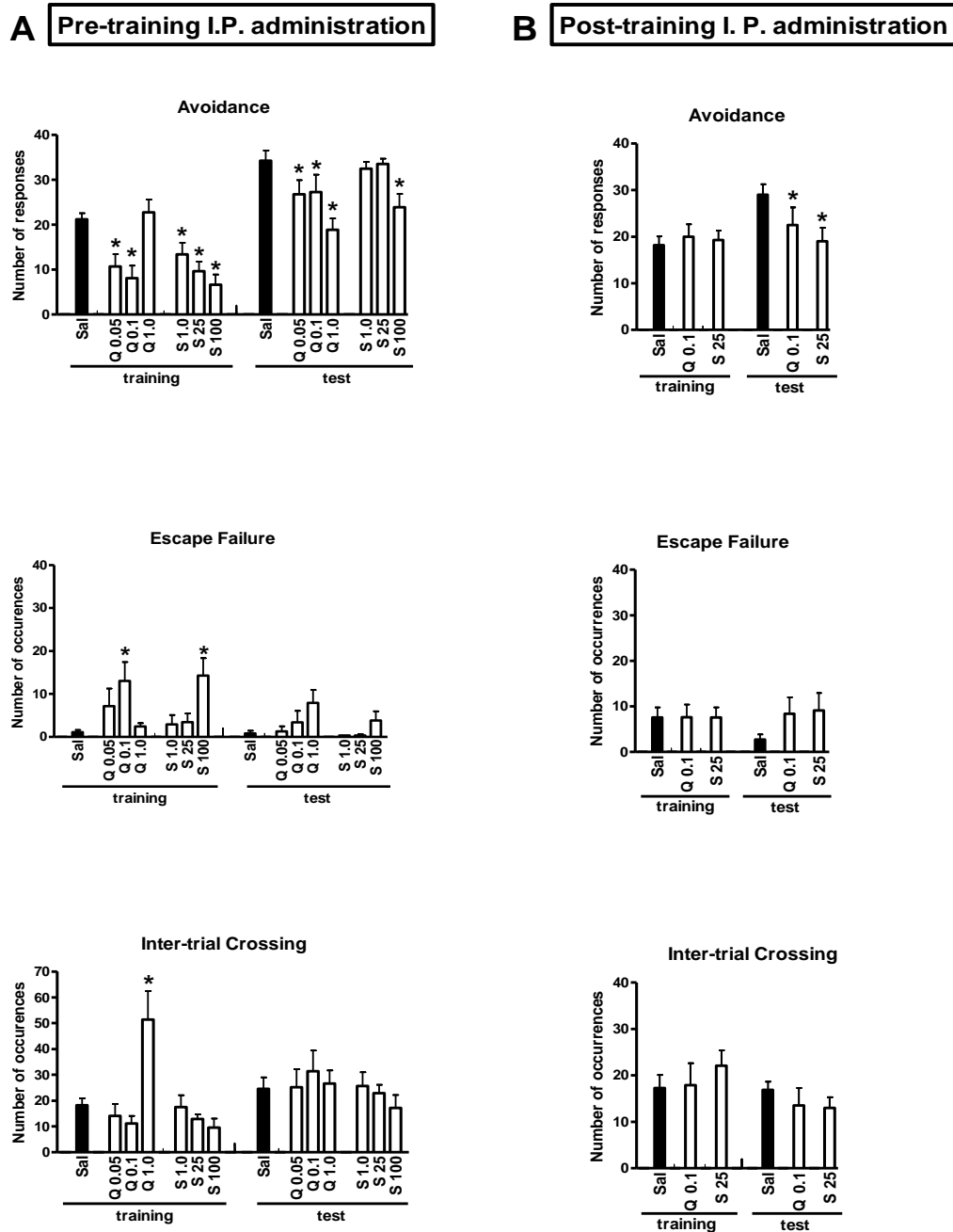


Figure 1. Effect of i.p. injections of saline (Sal), the dopaminergic D2 receptor agonist quinpirole (Q), or antagonist sulpiride (S), 20 min before or immediately after the training session on the 2-way active avoidance scores. The doses are expressed in mg/kg and the data are expressed as mean + SEM. * $p < 0.05$ compared to saline; $N = 8-10$.

Effects of Intra-NAc and Intra-DLS Infusions of Quinpirole and Sulpiride on Two-way Active Avoidance Scores

Data shown in Figures 2A and 3A confirm our prediction that drugs acting on D2 receptors cause an immediate effect on CARs when infused into the NAc, but a delayed effect when infused into the DLS. In addition, as shown in Figure 2B, blockade of D2 receptors in the NAc appears to impair memory consolidation. However, data shown in Fig. 3B do not support a role of D2 receptors in memory consolidation.

Two-way ANOVA showed the following effects for the **pre-training intra-NAc** administration of these drugs: (i) Number of avoidances: significant group [$F(4,44) = 5.06$; $p < 0.01$] and session [$F(1,44) = 42.77$; $p < 0.001$] effects but a non-significant group by session interaction [$F(4,44) = 0.10$; $p = 0.98$]; (ii) Number of escape failures: significant group [$F(4,44) = 10.14$; $p < 0.001$] and session [$F(1,44) = 47.92$; $p < 0.001$] effects and a significant interaction [$F(4,44) = 5.69$; $p < 0.001$]; (iii) ITC: significant group [$F(4,44) = 8.49$; $p < 0.001$] and session [$F(1,44) = 4.42$; $p < 0.05$] effects but no significant interaction [$F(4,44) = 0.60$; $p = 0.67$]. Post-hoc analysis showed that sulpiride, at the two given doses, prevented CAR almost completely in the training session and caused a significant reduction in the number of avoidances in the test session. This treatment also caused a significant increase in the number of escape failures and a significant reduction in the numbers of ITC in the training and test sessions; effects consistent with the antipsychotic properties previously reported for sulpiride and other D2 DA-R antagonists (20, 25). No doses of quinpirole affected the number of avoidances and ITC in either training or test sessions, but 5 µg/side caused a significant increase in the number of escape failures in the training session.

A two-way ANOVA showed the following effects for the **post-training** infusion of 5 µg/side quinpirole or 0.2 µg/side sulpiride into the **NAc**: (i) Number of avoidances: non-significant group effect [$F(2,21) = 1.19$; $p = 0.32$], significant session effect [$F(1,21) = 12.39$; $p < 0.01$] and significant group by session interaction [$F(2,21) = 4.97$; $p < 0.05$]; (ii) Number of escape failures: non-significant group effect [$F(2,21) = 1.44$; $p = 0.26$], significant session effect [$F(1,21) = 9.20$; $p < 0.01$] and a non-significant interaction [$F(2,21) = 1.57$; $p = 0.23$]. (iii) Number of ITC: significant group effect [$F(2,21) = 5.07$; $p < 0.05$], non-significant session effect [$F(1,21) = 0.24$; $p = 0.63$] and no-significant interaction [$F(2,21) = 1.94$; $p = 0.17$]. Post-hoc analysis

showed a significant reduction in the number of CARs and ITC in the test session, without significant alteration in the number of escape failures.

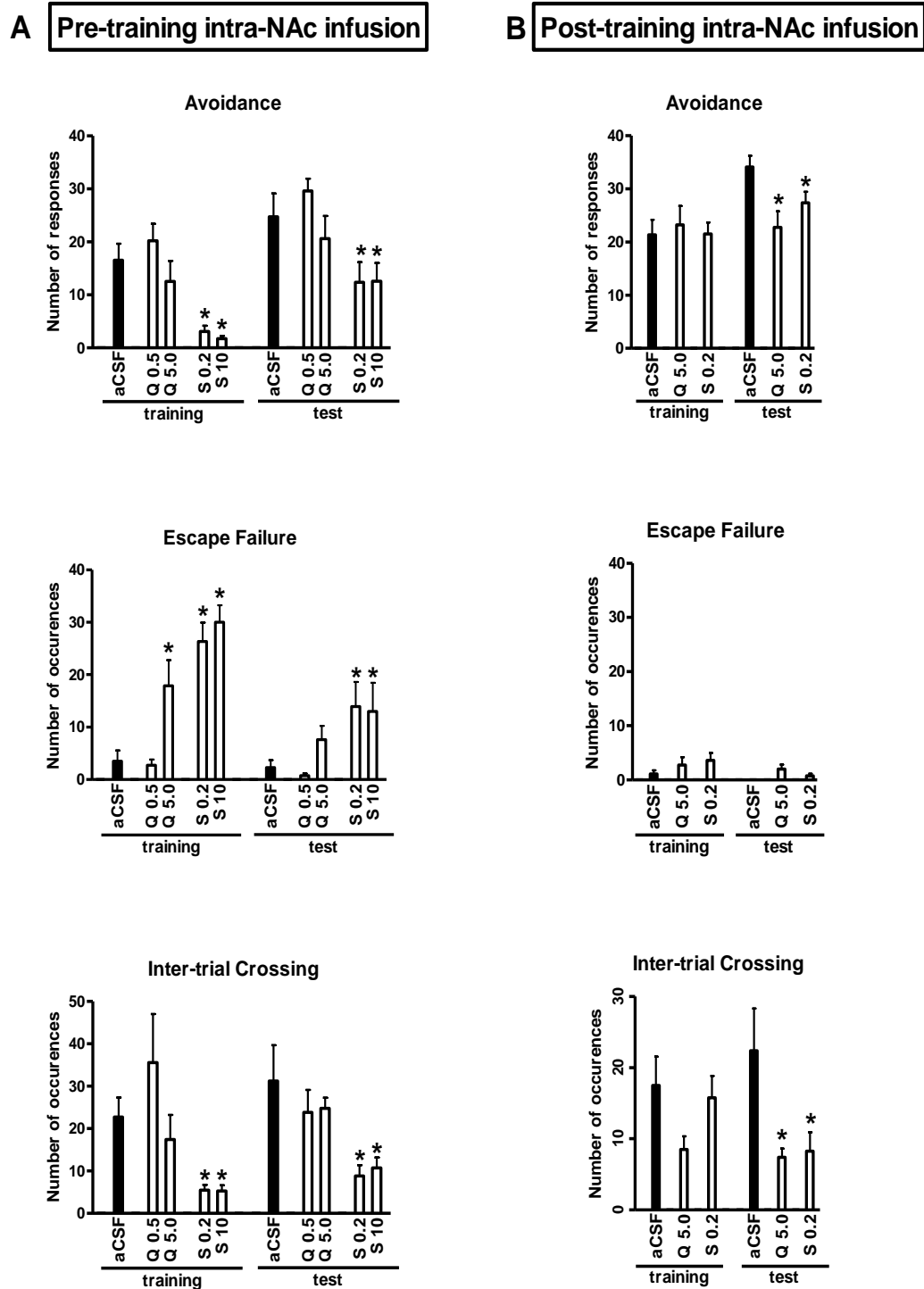


Figure 2. Effect of intra-nucleus accumbens (NAc) infusions of artificial cerebrospinal fluid (aCSF), the dopaminergic D2 receptor agonist quinpirole (Q), or antagonist sulpiride (S), immediately before or immediately after the training session on the 2-way active avoidance scores. The doses are expressed in $\mu\text{g}/\text{side}$ and the data are expressed as mean + SEM. * $p < 0.05$ compared to saline; $N = 8-10$.

A two-way ANOVA showed the following effects for the **pre-training** administration of quinpirole and sulpiride into the **DLS**: (i) Number of avoidances: significant group [$F(4,41) = 4.04$; $p < 0.05$] and session [$F(1,41) = 6.86$; $p < 0.05$] effects, but no significant group by session interaction [$F(4,41) = 1.06$; $p = 0.39$]; (ii) Number of escape failures: significant group [$F(4,41) = 3.84$; $p < 0.05$] and session [$F(1,41) = 5.63$; $p < 0.05$] effects but no significant interaction [$F(4,41) = 1.60$; $p = 0.19$]; (iii) Number of ITC: non-significant group [$F(4,41) = 2.58$; $p = 0.05$] and session [$F(1,41) = 0.52$; $p = 0.48$] effects, but a significant group by session interaction [$F(4,41) = 2.64$; $p < 0.05$]. Post-hoc analysis showed that 0.2 µg/side sulpiride caused a significant reduction in the number of avoidances in the test, but not in the training session, and a significant reduction in the number of ITC in the training session; 10 µg/side sulpiride caused a significant reduction of ITC; 5 µg/side quinpirole caused a significant increase in the number of escape failures and a significant decrease in the number of ITC in the training session.

Two-way ANOVA showed the following effects for the **post-training** administration of quinpirole and sulpiride into the **DLS**: (i) Number of avoidances: non-significant group effect [$F(2,16) = 0.65$; $p = 0.53$], significant session effect [$F(1,16) = 14.28$; $p < 0.01$] but no significant group by session interaction [$F(2,16) = 0.34$; $p = 0.71$]; (ii) Number of escape failures: non-significant group [$F(2,16) = 1.51$; $p = 0.25$] and session [$F(1,16) = 11.44$; $p < 0.01$] effects and no significant interaction [$F(2,16) = 1.65$; $p = 0.22$]; (iii) Number of ITC: non-significant group [$F(2,16) = 1.26$; $p = 0.31$] and session [$F(1,16) = 0.79$; $p = 0.39$] effects and no significant interaction [$F(2,16) = 0.66$; $p = 0.53$]. Post-hoc analysis showed no significant effects among the groups, in neither training nor test sessions.

Similar conclusions were taken from analysis of the number of avoidance responses scored in blocks of 10 trials (Fig. S1) and latencies to respond to the US and CS in the first day of training (Fig. S2).

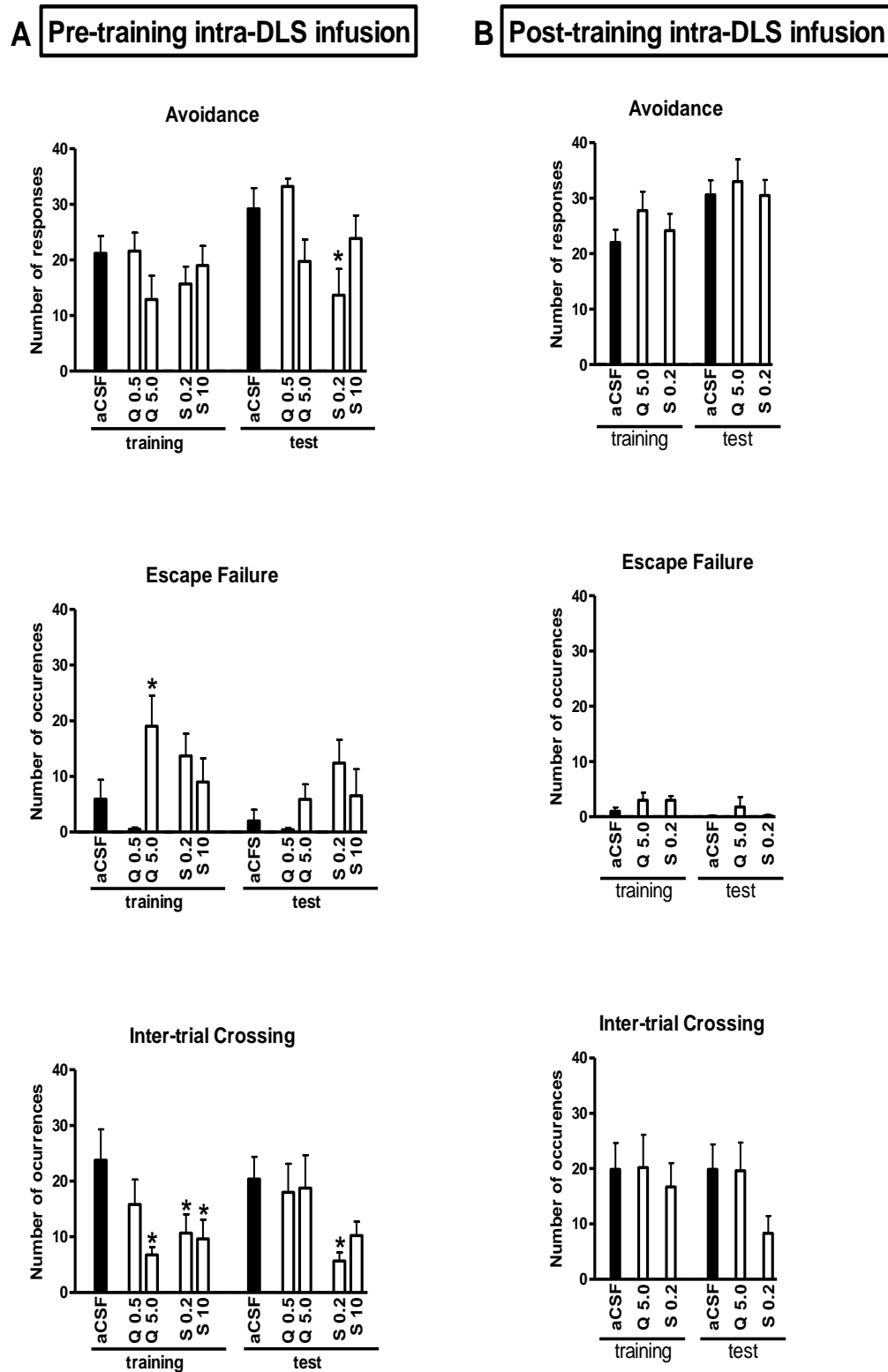


Figure 3. Effect of intra-dorsolateral striatum (DLS) infusions of artificial cerebrospinal fluid (aCSF), the dopaminergic D2 receptor agonist quinpirole (Q), or antagonist sulpiride (S), immediately before or immediately after the training session on the 2-way active avoidance scores. The doses are expressed in $\mu\text{g}/\text{side}$ and the data are expressed as mean + SEM. * $p < 0.05$ compared to saline; $N = 5-10$.

Unconditioned Reaction Time to the Footshock

One-way ANOVA of latency to respond after first presentation of the footshock (by escaping to the other shuttle box chamber) showed the following effects: (i) i.p. administration (Table 1): [$F(5,55) = 1.88$; $p = 0.11$]; (ii) intra-NAc (Table 2): [$F(4,44) = 2.60$ $p < 0.05$]; (iii) intra-DLS (Table 2): [$F(4,41) = 2.94$ $p < 0.05$]. However, post-hoc analysis showed no significant difference between each group and its control. The significant ANOVA effects occurred because the post-hoc analysis detected significant differences between groups in comparisons that did not involve the control group. This suggests that, before conditioning, the treatment with the given doses of quinpirole or sulpiride did not alter the reaction time to the footshock.

Table 1. Effects of the systemic administration of saline, the dopaminergic D2 receptor agonist quinpirole, or antagonist sulpiride, on the reaction time to the footshock.

Group	Latency (s)
Saline	11.22 ± 0.25
Quinpirole 0.05 mg / Kg	13.85 ± 1.22
Quinpirole 0.1 mg / Kg	14.56 ± 1.20
Quinpirole 1.0 mg / Kg	14.19 ± 1.06
Sulpiride 1.0 mg / Kg	11.43 ± 0.28
Sulpiride 25 mg / Kg	12.87 ± 0.71
Sulpiride 100 mg / Kg	12.41 ± 0.54

Drugs were given i.p. 30 min before testing the reaction time to footshock in the shuttle box. Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA showed no significant difference among the groups.

Table 2. Effects of the intra-NAc or intra-DLS infusions of the the dopaminergic D2 receptor agonist quinpirole, or antagonist sulpiride on the reaction time to the footshock.

Group	Latency (s)	
	Intra-NAc	Intra-DLS
aCSF	12.68 ± 0.86	14.36 ± 0.82
Quinpirole 0.5 µg / side	13.46 ± 0.86	13.45 ± 0.91 #
Quinpirole 5.0 µg / side	15.55 ± 1.27	17.79 ± 1.06 #
Sulpiride 0.2 µg / side	16.52 ± 1.10	17.11 ± 1.18
Sulpiride 10 µg / side	16.15 ± 1.47	15.45 ± 1.36

Drugs were given 10 min before testing the reaction time to footshock in the shuttle box. Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test showed a statistically difference of $p < 0.05$ between 0.5 µg / side quinpirole and 5.0 µg / side quinpirole.

Histology

Locations of the tips of the injection needles are shown in Figure 4. All cannulae were appropriately located. All the NAc cannulae terminated in the core, except for 1 rat that received aCSF infusion into the border between the left NAc core and shell regions, and 2 others that received 0.2 µg sulpiride into the right border between the NAc core and shell region. The scores of these animals were in the range of the mean ± SEM of their groups. However, we chose to report as a NAc, instead of NAc-core effect of these drugs, because the volume in which they were injected (0.4 µl/side) most probably diffused to the shell region.

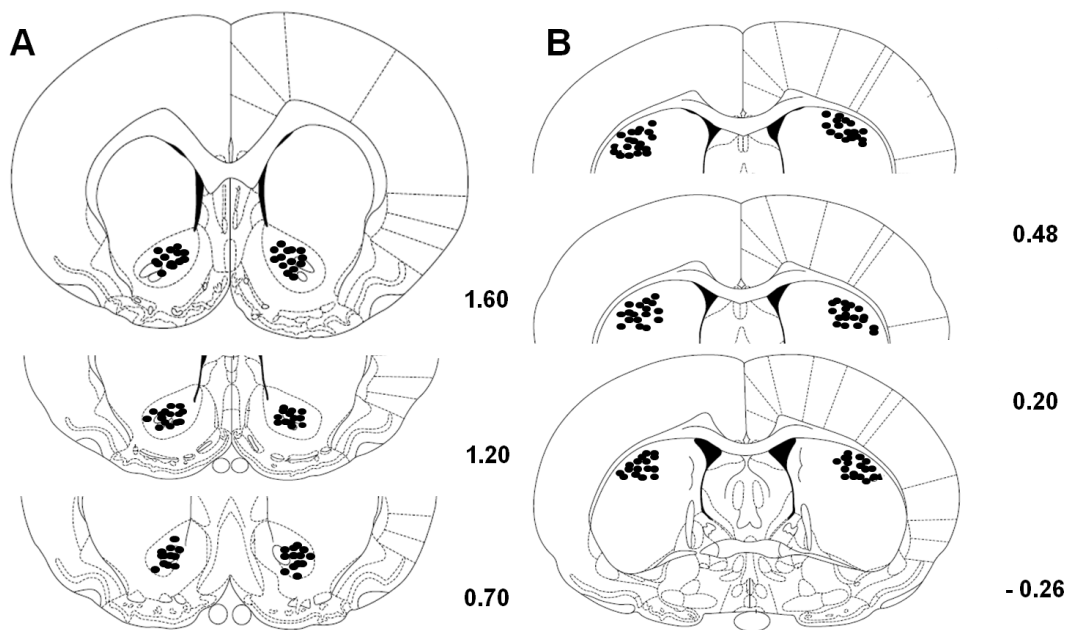


Figure 4. Schematic coronal sections showing the locations of the tip of the cannulae used to infuse drugs into the nucleus accumbens (NAc) (A) or dorsolateral striatum (DLS) (B). On the right of each section, the approximate distance (mm) from bregma is indicated, according to the atlas of Paxinos and Watson (21).

Discussion

The main finding of the present study was that blockade of D2-like receptors in the NAc caused an immediate reduction in the number of CARs but blockade of D2 receptors in the DLS caused a decrease in CAR responding only in the test session. This suggests that activation of D2 receptors in the DLS is needed for a slow learning of CAR, as occurs for S-R habit learning, while activation of D2 receptors in the NAc is needed for a fast learning of CAR, as occurs for learning of goal-directed actions. This is in agreement with the hypothesis that S-R habits depends on the DLS and Pavlovian conditioning and goal-directed actions depends on the NAc (17).

A combination of these immediate and delayed effects on CAR was observed after the systemic administration of sulpiride, even in doses that did not affect locomotor activity (ITC) and did not cause escape failures. In addition, systemic administration of the D2 agonist quinpirole in doses that decrease DA release (26) also impaired CAR. This suggests that side effects of antipsychotics may be mediated by the DLS and NAc D2 receptors. Similar deficits in responding to cues of

rewarding events have been reported for schizophrenics and are attributed to a dysfunctional mesolimbic DA system (1, 27).

Our results are also consistent with a previous study reporting that sulpiride (0.2 µg/side) caused an immediate reduction in CAR performance when infused into the NAc, but when infused into the DLS, it caused the same effect only when administered 90 min before (20). The authors attributed this delayed effect to a slow diffusion of the drug to the NAc. This explanation does not apply to the present results because we observed this effect 24 h after the intra-DLS administration, while post-training administration of 0.2 µg/side sulpiride did not cause the same effect. In addition, if it were the case that diffusion between regions was a significant factor, higher doses of sulpiride infused into the DLS would be expected to cause higher effects on CAR. However, the opposite happened: infusion of sulpiride into the DLS in a dose 50 times higher caused no effect at all. This inverted U shaped dose-response curve occurred probably because, depending on the dose, sulpiride may block postsynaptic or presynaptic D2 receptors (8).

In vitro studies indicate that D2-like receptors might affect response to environmental stimuli by pre- and post-synaptic mechanisms: (i) increasing signal-to-noise ratio in the corticostriatal neurotransmission (28, 29); and (ii) inhibiting the indirect pathway, facilitating the initiation of the proper action (30). Activation of D2 receptors is also implicated in synaptic plasticity (7). The finding that post-training systemic or intra-NAc administration of quinpirole and sulpiride decreased the number of avoidance scores in the test session suggests that the release of DA and/or glutamate (impaired by quinpirole) and the activation of post-synaptic D2 receptors (blocked by sulpiride) in the NAc are needed for memory consolidation of CARs, a finding in agreement with previous studies reporting a role for D2 receptors in the consolidation of other memory tasks (7, 31-39).

The post-training infusion of these drugs into the DLS did not affect the number of avoidances in the test session, a finding that apparently does not support a role for DLS D2 receptors in memory consolidation of CARs. However, clearance of the phasic DA signal is shorter in the DLS compared to the NAc (40) and the CAR task required long sessions (40 CS-US pairings; nearly 25 min) while most studies on memory consolidation use tasks that can be learnt in a single trial (41). Therefore, it is possible that the post-training effect of sulpiride on memory consolidation was observed when it was infused into the NAc, but not into the DLS, because along the

training session, the DA released at each CS-US pairing accumulated in the NAc, but not in the DLS.

The high number of escape failures caused by infusion of sulpiride into the NAc suggests that it inhibits the initiation of both conditioned and unconditioned responses. Intra-NAc infusion of sulpiride also decreased the ITC and, in other studies, decreased locomotor activity (20). This seems to mimic the apathy observed in patients treated with antipsychotics (42). Previous studies showed that reduction of both locomotion and CAR correlates with the blockade of D2 receptors (43) and that CARs are sensitive to both typical and atypical antipsychotics (44). Therefore, it is difficult to dissociate the effects of sulpiride on CAR and locomotor activity. As pointed out by Di Chiara (45), considering response-reinforcement apart from motor performance is difficult because DA plays important roles in both functions. In addition, the view that DA facilitates choice of previously reinforced motor actions binds cognitive and motor aspects of action in a single function.

The role of DA in rewarding motivated actions is well established, but its role in learning aversively motivated tasks is controversial (46, 47). The present study reinforces the hypothesis that DA is involved in learning aversively motivated tasks. This is in agreement with a recent study showing that some polymorphisms in human genes associated with the expression of D2 receptors in the striatum strongly predict efficient avoidance-based decisions (29). In animal studies, it has been shown that rats submitted to inescapable footshocks undergo a form of learned helplessness that makes them irresponsive the next time they face the same environment (48). This might have caused the high number of escape failures when the rats received sulpiride in the NAc before the training session.

In summary, the findings of the present study suggest a differential role for the D2 receptors of the NAc and DLS on CAR learning and performance. The former seems to be critical for fast adaptation of responding to unconditioned and conditioned aversive stimuli and the latter to slower learning of how to respond to conditioned stimuli based on previous experiences.

Acknowledgements

The authors thank the financial support from CNPq, Fundação Araucária and CAPES and the technical assistance of Sílvia N. Cordazzo.

Financial Disclosures

The authors reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

References

1. Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E (2010): A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron*. 65:585-596.
2. Voorn P, Vanderschuren L, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA (2004): Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci*. 27:468-474.
3. McGeorge AJ, Faull RLM (1989): The organization of the projection from the cerebral-cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*. 29:503-537.
4. Da Cunha C, Wietzikoski EC, Dombrowski P, Santos LM, Bortolanza M, Boschen SL, et al. (2009): Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. *Behav Brain Res*. 199:156-169.
5. Parent A, Hazrati LN (1995): Functional-anatomy of the basal ganglia .1. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev*. 20:91-127.
6. Matsumoto M, Hikosaka O (2009): Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nat Neurosci*. 459:838-842.
7. Lovinger DM (2010): Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology*. 58:951-961.
8. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang ZF, Shen WX (2007): D1 and d2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. 30:228-235.
9. Hooper KC, Banks DA, Stordahl LJ, White IM, Rebec GV (1997): Quinpirole inhibits striatal and excites pallidal neurons in freely moving rats. *Neurosci Lett*. 237:69-72.
10. Dias FRC, Carey RJ, Carrera MP (2010): Apomorphine-induced context-specific behavioural sensitization is prevented by the d1 antagonist sch-23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the d2 antagonist sulpiride. *Psychopharmacology*. 209:137-151.
11. Fadok JP, Darvas M, Dickerson TMK, Palmiter RD (2010): Long-term memory for pavlovian fear conditioning requires dopamine in the nucleus accumbens and basolateral amygdala. *PLoS One*. 5.
12. Day JJ, Carelli RM (2007): The nucleus accumbens and pavlovian reward learning. *Neuroscientist*. 13:148-159.

13. Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW (2008): Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: The integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *Eur J of Neurosci.* 28:1437-1448.
14. Wadenberg MLG (2010): Conditioned avoidance response in the development of new antipsychotics. *Cur Pharmacol Des.* 16:358-370.
15. Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O (2007): The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J Neurosci.* 27:8161-8165.
16. Yin HH, Knowlton BJ (2006): The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci.* 7:464-476.
17. Balleine BW, O'Doherty JP (2010): Human and rodent homologues in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology.* 35:48-69.
18. Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ (1999): Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by d-amphetamine. *J Neurosci.* 19:2401-2411.
19. Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW (2008): Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: The integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *Eur J Neurosci.* 28:1437-1448.
20. Wadenberg ML, Ericson E, Magnusson O, Ahlenius S (1990): Suppression of conditioned avoidance-behavior by the local application of (-)sulpiride into the ventral, but not the dorsal, striatum of the rat. *Biol Psychiatry.* 28:297-307.
21. Paxinos G, Watson C (2005): The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA, USA: Academic Press, Ltd.
22. Stuchlik A (2007): Further study of the effects of dopaminergic d1 drugs on place avoidance behavior using pretraining: Some negative evidence. *Behav Brain Res.* 178:47-52.
23. Swanson CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE (1997): Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacol Biochem and Behav.* 58:933-945.
24. Crescimanno G, Emmi A, Amato G (1998): Effects of intraaccumbens microinjections of quinpirole on head turning and circling movement in the rat. *Pharmacol Biochem and Behav.* 60:829-834.

25. Wadenberg MLG, Kapur S, Soliman A, Jones C, Vaccarino F (2000): Dopamine d-2 receptor occupancy predicts catalepsy and the suppression of conditioned avoidance response behavior in rats. *Psychopharmacology*. 150:422-429.
26. Perreault ML, Graham D, Bisnaire L, Simms J, Hayton S, Szechtman H (2006): Kappa-opioid agonist u69593 potentiates locomotor sensitization to the d2/d3 agonist quinpirole: Pre- and postsynaptic mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 31:1967-1981.
27. Simon JJ, Biller A, Walther S, Roesch-Ely D, Stippich C, Weisbrod M, et al. (2010): Neural correlates of reward processing in schizophrenia - relationship to apathy and depression. *Schizophr Res*. 118:154-161.
28. Cepeda C, Levine MS (1998): Dopamine and n-methyl-d-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Develop Neurosci*. 20:1-18.
29. Frank MJ, Hutchison K (2009): Genetic contributions to avoidance-based decisions: Striatal d2 receptor polymorphisms. *Neuroscience*. 164:131-140.
30. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986): Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*. 9:357-381.
31. Setlow B, McGaugh JL (1999): Involvement of the posteroventral caudate-putamen in memory consolidation in the morris water maze. *Neurobiol Learn Mem*. 71:240-247.
32. Bach ME, Simpson EH, Kahn L, Marshall JJ, Kandel ER, Kellendonk C (2008): Transient and selective overexpression of d-2 receptors in the striatum causes persistent deficits in conditional associative learning. *Proceed of the Nat Acad of Sci of the USA*. 105:16027-16032.
33. Drew MR, Simpson EH, Kellendonk C, Herzberg WG, Lipatova O, Fairhurst S, et al. (2007): Transient overexpression of striatal d-2 receptors impairs operant motivation and interval timing. *J Neurosci*. 27:7731-7739.
34. Castro CC, Dos Reis-Lunardelli EA, Schmidt WJ, Coitinho AS, Izquierdo I (2007): Clozapine and olanzapine but not risperidone impair the pre-frontal striatal system in relation to egocentric spatial orientation in a y-maze. *Curr Neurovasc Res*. 4:235-239.
35. Izquierdo I (1992): Dopamine receptors in the caudate nucleus and memory processes. *Trends Pharmacol Sci*. 13:7-8.

36. Setlow B, McGaugh JL (1998): Sulpiride infused into the nucleus accumbens posttraining impairs memory of spatial water maze training. *Behav Neurosci.* 112:603-610.
37. Setlow B, McGaugh JL (2000): D2 dopamine receptor blockade immediately post-training enhances retention in hidden and visible platform versions of the water maze. *Learn Mem.* 7:187-191.
38. Boulougouris V, Castane A, Robbins TW (2009): Dopamine d2/d3 receptor agonist quinpirole impairs spatial reversal learning in rats: Investigation of d3 receptor involvement in persistent behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 202:611-620.
39. Pezze MA, Dalley JW, Robbins TW (2007): Differential roles of dopamine d1 and d2 receptors in the nucleus accumbens in attentional performance on the five-choice serial reaction time task. *Neuropsychopharmacology.* 32:273-283.
40. Wickens JR, Budd CS, Hyland BI, Arbuthnott GW (2007): Striatal contributions to reward and decision making. Making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann NY Acad Sci.* 1104:192-212.
41. McGaugh JL, Roozendaal B (2009): Drug enhancement of memory consolidation: Historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology.* 202:3-14.
42. Schlagenhauf F, Juckel G, Koslowski M, Kahnt T, Knutson B, Dember T, et al. (2008): Reward system activation in schizophrenic patients switched from typical neuroleptics to olanzapine. *Psychopharmacology.* 196:673-684.
43. Wadenberg MLG, Jones C, Kapur S, Soliman A, Vaccarino F, Wilson A (2000): Quantitative relationship between in vivo dopamine d2 receptor occupancy and catalepsy in rats. *Internat J of Psychol.* 35:421-421.
44. Wadenberg MLG, Hicks PB (1999): The conditioned avoidance response test re-evaluated: Is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics? *Neurosci and Biobehav Rev.* 23:851-862.
45. Di Chiara G (2002): Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res.* 137:75-114.
46. Morris G, Schmidt R, Bergman H (2010): Striatal action-learning based on dopamine concentration. *Exp Brain Res.* 200:307-317.
47. Schultz W (2010): Dopamine signals for reward value and risk: Basic and recent data. *Behav Brain Funct.* 6:9.

48. Wang WF, Lei YP, Tseng T, Hsu WY, Wang CF, Hsu CC, et al. (2007): Effects of apomorphine on the expression of learned helplessness behavior. *Chin J Physiol.* 50:63-68.

Supplemental Information

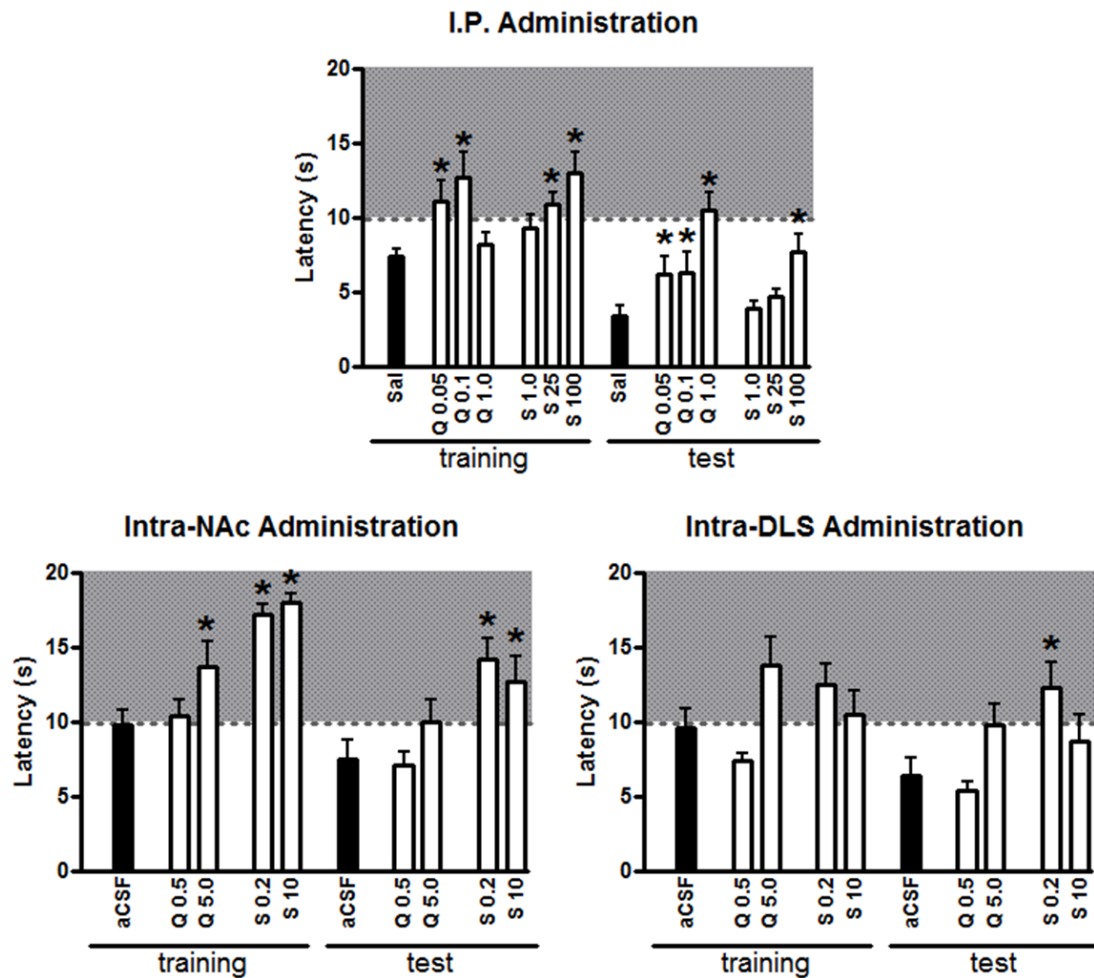


Figure S1. Effect of the i.p., intra-NAc, and intra-DLS administration of the D2 receptor agonist quinpirole or the D2 receptor antagonist sulpiride on the latency (s) to respond to the light cue and footshock in the two-way active avoidance task. Doses under the bars are expressed as mg/kg (i.p. administration) or ug/site (intra-Nac and intra-DLS administration) and data are expressed as mean \pm SEM * $p < 0.05$ compared to saline in the i.p. administration or compared to aCSF in the intra-Nac and intra-DLS administration; (N = 8 – 10 animals/group). Abbreviations: Sal, saline, aCSF, artificial cerebrospinal fluid; Q, quinpirole; S, sulpiride.

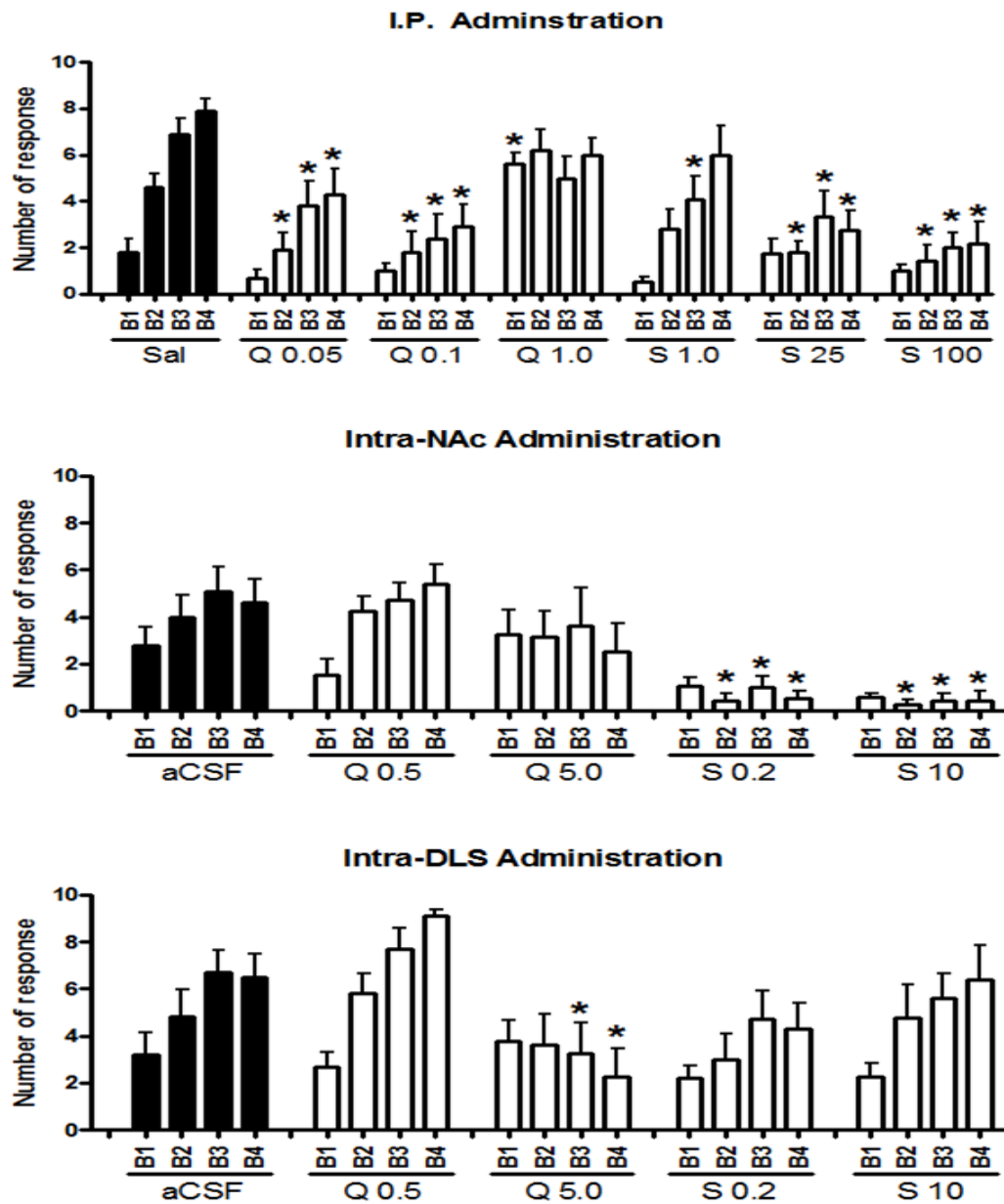


Figure S2. Effect of the i.p., intra-NAC, and intra-DLS administration of the D2 receptor agonist quinpirole or the D2 receptor antagonist sulpiride on conditioned avoidance response per block of 10 trials on the training session. Doses under the bars are expressed as mg/kg (i.p. administration) or ug/side (intra-NAC and intra-DLS administration) and data are expressed as mean \pm SEM * $p < 0.05$ compared to saline in the i.p. administration or compared to aCSF in the intra-NAC and intra-DLS administration; (N = 8 – 10 animals/group). Abbreviations: Sal, saline, aCSF, artificial cerebrospinal fluid; Q, quinpirole; S, sulpiride.

Table S1: Two-way ANOVA statistics of the 2-way active avoidance on latency (s) scores after the pre-training i.p., intra-NAc and intra-DLS infusions of the D2-dopamine receptor agonist, quinpirole, and the D2 receptor antagonist, sulpiride.

I.P.

	Group		Session		Interaction	
	<i>F</i> (6,65)	P	<i>F</i> (1,65)	P	<i>F</i> (6,65)	P
Latency	3.29	0.01	124.16	0.0001	8.55	0.0001

Intra-NAc

	Group		Session		Interaction	
	<i>F</i> (4,44)	P	<i>F</i> (1,44)	P	<i>F</i> (4,44)	P
Latency	10.95	0.0001	38.78	0.0001	0.72	0.58

Intra-DLS

	Group		Session		Interaction	
	<i>F</i> (4,41)	P	<i>F</i> (1,41)	P	<i>F</i> (4,41)	P
Latency	4.90	0.005	11.49	0.005	0.98	0.43

Table S2: Two-way ANOVA statistics of the 2-way active avoidance on the number of conditioned avoidance responses per block of 10 trials on the training session after the pre-training i.p., intra-NAc and intra-DLS infusions of the D2-dopamine receptor agonist, quinpirole, and the D2 receptor antagonist, sulpiride.

I.P.

	Group		Session		Interaction	
	<i>F</i> (6,65)	P	<i>F</i> (3,195)	P	<i>F</i> (18,195)	P
CAR	6.85	0.0001	31.25	0.0001	3.31	0.0001

Intra-NAc

	Group		Session		Interaction	
	<i>F</i> (4,44)	P	<i>F</i> (3,132)	P	<i>F</i> (12,132)	P
CAR	7.55	0.001	3.73	0.05	2.88	0.01

Intra-DLS

	Group		Session		Interaction	
	<i>F</i> (4,41)	P	<i>F</i> (3,123)	P	<i>F</i> (12,132)	P
CAR	2.55	0.05	16.86	0.0001	2.84	0.01

4 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados do presente trabalho mostram, de maneira geral, que os receptores dopaminérgicos D2 apresentam um importante papel na aprendizagem e memória da tarefa de esquiva ativa de duas vias, uma vez que a administração pré-treino sistêmica e intra-estriatal do antagonista ((-)-sulpiride) e do agonista (quimpirole) em doses baixas reduziu o número de respostas condicionadas de esquiva (CAR). Além disso, a administração pós-treino dessas drogas também produziu a redução do número de CAR quando infundidas por via intra-NAc ou sistêmica, o que demonstra o importante envolvimento da dopamina em processos de aprendizagem e memória de tarefas de cunho aversivo.

Embora existam pontos de consenso, a questão do significado e função da liberação de dopamina no estriado é um dos pontos de maior controvérsia. A sua liberação frente a um estímulo apetitivo é explicada como a representação neural do valor hedônico do estímulo incondicionado para uns (Lekne e Tracey, 2006); como uma medida de discrepância entre a expectativa do reforço e sua contingência para outros (Schultz, 2007); como uma sinalização da saliência de incentivo de estímulos ambientais (Berridge, 2007); ou simplesmente como uma sinalização de novidade (Redgrave et al., 2008).

As alterações na liberação de dopamina frente a estímulos aversivos são ainda mais controversas. Sabe-se que estímulos aversivos também desencadeiam uma resposta fásica de dopamina (Matsumoto e Hikosaka, 2009), mas estudos de microdiálise *in vivo* e os estudos mais antigos de registro de célula unitária em animais acordados divergem sobre a natureza inibitória ou excitatória dessa resposta (Nicola, 2007; Horvitz, 2009).

Um estudo recente de microdiálise *in vivo* realizado por nosso grupo de pesquisa mostra que ratos apresentam aumento da concentração extra-sináptica de dopamina enquanto estão aprendendo a se esquivar de choques nas patas na esquiva ativa de duas vias. Depois que esses animais aprendem a desempenhar a tarefa, não se verifica mais a ocorrência desse aumento na concentração extra-sináptica de dopamina. Além disso, os dados mostram que é possível prever a rapidez do aprendizado de acordo com o tamanho dos picos de dopamina obtidos (Dados não publicados). Esses resultados sugerem que a dopamina tem um papel

crítico na aprendizagem com motivação aversiva, sendo que a liberação deste neurotransmissor ocorre de forma a promover o aprendizado de algo novo.

Segundo a teoria do papel da dopamina como sinalizadora do erro de predição (Schultz, 2007), a ativação fásica dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo é máxima quando um estímulo apetitivo é liberado de forma imprevisível, ou seja, quando o animal não espera receber uma recompensa e a recebe. Por outro lado, tal ativação é baixa em condições de certeza, quando o animal já aprendeu que a probabilidade de ocorrência do estímulo apetitivo é máxima após a apresentação do som: o animal espera receber a recompensa e recebe. Em relação à esquiva ativa dizemos que esse fenômeno provavelmente ocorre também com estímulos aversivos, levando em conta os estudos com a liberação de dopamina durante a aprendizagem de outras tarefas aversivas (Matsumoto e Hikosaka, 2009), assim como ocorre com as tarefas com motivação apetitiva (Fiorillo et al., 2003). Nossos resultados estão de acordo com a teoria supracitada, pois o bloqueio dos receptores D2 pós e pré-sinápticos prejudicou o aprendizado da tarefa ao reduzir o número de CAR.

Os resultados de administração sistêmica de quimpirole e sulpiride estão de acordo com outros estudos que demonstraram resultados similares (Nader e LeDoux, 1999; Stuchlick et al., 2007). Doses menores de quimpirole (0,05 e 0,1 mg/Kg) administradas antes do treinamento reduziram o número de CAR na sessão treino e teste, sugerindo que esta droga impediu o aprendizado da tarefa de esquiva ativa de duas vias. Nader e LeDoux (1999) também reportaram prejuízos cognitivos quando testaram ratos em uma tarefa de condicionamento de medo de segunda ordem, uma tarefa de condicionamento Pavloviano a um estímulo aversivo, um dos elementos que envolvem o aprendizado da esquiva ativa de duas vias (Balleine, 2007). Estes pesquisadores mostraram que a administração sistêmica de quimpirole impediu a aquisição da associação entre os estímulos condicionados e incondicionado (CSs; CS1–CS2) (Nader e Ledoux, 1999).

A administração sistêmica da maior dose de quimpirole (1,0 mg/Kg) não foi efetiva em reduzir o número de CAR na sessão treino, entretanto aumentou o número de cruzamentos inter-provas (ITC, do inglês *inter-trial crossing*) nesta mesma sessão. Stuchlick e colaboradores (2007) também demonstraram que a administração de doses maiores de quimpirole causaram aumento da atividade locomotora, enquanto doses menores não produziram nenhum efeito no

comportamento locomotor (Stuchlick et al., 2007). Nosso trabalho reportou este aumento somente com a dose de 1,0 mg/Kg. Essa diferença pode ser decorrente da utilização de ratos de diferentes linhagens, tendo os nossos uma sensibilidade diferente para essa droga. A natureza da tarefa de esquiva usada por Stuchlick e colaboradores também foi diferente. De qualquer forma, também encontramos esse padrão de atividade locomotora aumentada na maior dose. Sugere-se que isto se deve à ação da droga em receptores pré-sinápticos em doses menores, enquanto com doses maiores este efeito é sobreposto pela interação com receptores D2 pós-sinápticos (Surmeier et al., 2007; Dias et al., 2010). Em receptores D2 pré-sinápticos, que funcionam como auto-reguladores negativos, quimpirole inibiria a liberação de dopamina pelos terminais sinápticos. Assim, haveria uma redução da dopamina disponível para agir em receptores D1 e D2 pós-sinápticos e promover, dessa forma, o controle das vias direta e indireta do circuito córtico-basal e também a plasticidade sináptica importante para o aprendizado da tarefa (Lovinger, 2010).

Ao reduzir a concentração de dopamina tônica nas sinapses, a via indireta deixa de ser inibida pela ligação desse neurotransmissor aos receptores D2 e a via direta deixa de ser ativada pela dopamina agindo em receptores D1 (ver Figura 2). O resultado seria a dificuldade de escolher ações apropriadas (Da Cunha et al., 2009). Além disso, a plasticidade sináptica também estaria comprometida, pois haveria uma menor liberação fásica de dopamina e de glutamato (Hooper et al., 1997). Isto prejudicaria a ocorrência de LTD nas sinapses da via indireta que representam ações inadequadas, e de LTP nas sinapses da via direta que representam a ação mais apropriada (Cepeda e Levine, 1998; Frank e Hutchinson, 2009). Como resultado, o processo de escolher ações adequadas em resposta a estímulos ambientais que sinalizam uma consequência, tal como realizar uma esquiva em resposta ao CS, fica prejudicado (Di Filippo et al., 2009). Esse pode ter sido o motivo pelo qual animais que receberam doses menores de quimpirole, provavelmente pré-sinápticas, apresentaram redução do número de CAR.

No mesmo estudo de Stuchlick e colaboradores (2007), foi demonstrado que sulpiride na maior dose (100 mg/Kg) provocou prejuízos cognitivos em uma tarefa que envolve o comportamento de evitar um estímulo aversivo, que era, neste caso, uma área de um campo aberto delimitada por pistas espaciais (Stuchlick et al., 2007). Também verificamos, em nosso estudo, um prejuízo cognitivo na sessão de treino evidenciado pela redução dose-dependente do número de CARs nas três

doses de sulpiride administradas (1, 25 e 100 mg/Kg). Entretanto, somente a maior dose foi responsável pela redução de CARs na sessão teste, assim como no estudo supracitado. Apesar da tarefa do experimento de Stuchlick requerer sistemas neurais de memória espacial, os quais não são necessários para a esquivas ativa de duas vias, é importante lembrar que em ambos os casos a administração da droga foi sistêmica, portanto poderia agir sobre diversos sistemas neurais e produzir seu efeito por um ou por outro.

São também objeto de debate as diferenças funcionais entre o estriado dorsal e o NAc (Nicola, 2007). As informações usadas para a seleção da ação pelo estriado não chegam de forma homogênea nesta estrutura. Em roedores a porção ventral do estriado (incluindo o NAc) recebe informações sobre o valor hedônico de estímulos através de projeções de estruturas límbicas; a parte dorso-medial do estriado (DMS) recebe informações do córtex pré-frontal sobre objetivos e metas a serem atingidas; e a parte dorso-lateral do estriado (DLS) recebe informações dos córtex sensorial e motor sobre partes do corpo, estímulos sonoros e visuais de objetos (tal como propõe o modelo do Mosaico dos Espelhos Quebrados) (Balleine e O'Doherty, 2009; Da Cunha et al., 2009). Devido a essas diferenças acredita-se que o NAc, DMS e DLS têm um papel importante nas ações mediadas por condicionamento Pavloviano, ações direcionadas a um objetivo e ações mediadas por hábitos E-R, respectivamente (Balleine, 2007; Balleine e O'Doherty, 2009).

Neste estudo, propomos que o NAc pode mediar um tipo de aprendizado mais flexível, e conseqüentemente mais rápido, tal como ocorre nas ações direcionadas a um objetivo, enquanto o DLS realiza um aprendizado mais lento e inflexível, como ocorre com os hábitos E-R. Os resultados obtidos mostram que a infusão pré-treino de sulpiride no NAc reduziu o número de CARs imediatamente na sessão treino, o que não aconteceu com a infusão pré-treino no DLS, que produziu uma resposta semelhante somente no dia seguinte, na sessão teste. Resultados similares foram encontrados por Wadenberg e colaboradores (1990) demonstrando que a infusão de sulpiride no NAc também provocou um prejuízo imediato do comportamento de CAR, efeito que só foi observado 90 minutos após a infusão dessa droga no DLS (Wadenberg et al., 1990). Esses pesquisadores atribuíram este efeito retardado do DLS ao tempo de difusão da droga até o NAc. Não acreditamos que esta tenha sido a razão para o efeito tardio da infusão intra-DLS em nossos experimentos por diversos motivos: (i) os efeitos da infusão intra-DLS foram

observados 24 horas após sua realização, tempo suficiente para a eliminação da droga a partir do DLS ou da difusão para o NAc; (ii) a infusão de uma dose cinquenta vezes maior no DLS não produziu nenhum efeito sobre o comportamento de CAR, diferentemente do que seria esperado: uma dose maior teria uma difusão maior, portanto seus efeitos seriam mais evidentes; (iii) o formato em U invertido da curva dose-resposta pode ter sido ocasionado pelo bloqueio de receptores D2 pré-sinápticos, que varia de acordo com a dose administrada, em neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos.

A infusão pré-treino de sulpiride no NAc produziu, além da redução de CARs, redução de ITCs e aumento do número de falhas de fuga. Aguilar e colaboradores (2000) observaram efeitos semelhantes com a infusão intra-NAc de raclopride, um outro antagonista de receptores D2, durante a fase de aquisição da esquiva ativa de duas vias, mas não durante a fase de performance. Neste caso, os animais eram submetidos a três dias de treino que correspondiam à fase de aquisição em que recebiam infusão da droga (Aguilar et al., 2000). É possível que durante este período, apesar de estarem sob efeito do antagonista, os animais tenham passado por algum processo de aprendizagem. Em nossos experimentos, os animais foram submetidos a apenas duas sessões da esquiva ativa, sendo que em uma delas estavam sob efeito de sulpiride e, portanto, não tiveram a mesma oportunidade de aprendizado.

É possível também que os animais tenham realizado um pequeno número de CARs por terem executado, na verdade, muitas falhas de fuga, comportamento no qual os animais não respondem ao CS (luz) nem ao US (choque nas patas). O elevado número de falhas de fuga pode ser resultado de uma forma de desamparo aprendido que os ratos possam ter adquirido durante a sessão treino da esquiva ativa de duas vias. O desamparo aprendido é um modelo animal utilizado no estudo da fisiopatologia da depressão, bem como verificar o potencial antidepressivo de novas drogas (Takamori et al., 2001; Kram et al., 2002; Wang et al., 2007). Há uma série de sistemas cerebrais envolvidos no desamparo aprendido e na depressão. Dentre os diversos mecanismos propostos, está o hipometabolismo da via mesolímbica, que envolve a ATV e o estriado ventral (Shumake e Gonzalez-Lima, 2003). A administração de sulpiride (0,2 e 10 µg/Kg) e também de quimpirole na maior dose (5 µg/Kg) aumentaram consideravelmente o número de falhas de fuga na sessão treino. Este efeito foi mantido na sessão teste somente com o antagonista.

Estudos anteriores mostraram que sulpiride administrado sistemicamente em ratos submetidos a um protocolo experimental do modelo de desamparo aprendido também foi capaz de aumentar o número de falhas de fuga e de reverter a ação antidepressiva de drogas que haviam reduzido a frequência deste comportamento (Takamori et al., 2001; Wang et al., 2007). Esses dados em conjunto sugerem que a atividade dos receptores dopaminérgicos D2 pode estar associada com um papel adaptativo ou protetor dos mesmos em relação a estímulos ambientais estressores.

Em nosso estudo, conseguimos isolar o papel dos receptores D2 no NAc e no DLS, mostrando, além da ativação imediata e retardada dessas estruturas no aprendizado da tarefa de esquiva ativa de duas vias, que eles possuem uma função importante no processamento de estímulos aversivos condicionados. Isso é especialmente relevante para o NAc, estrutura que participa da via mesolímbica, e cuja hiperatividade é implicada na fisiopatologia da esquizofrenia (Mikell et al., 2009; Simpson et al., 2010). Esses efeitos isolados aparecem de maneira combinada na administração sistêmica de quimpirole e sulpiride, na qual podemos observar não só a redução de CARs nas sessões treino (aprendizado rápido do tipo A-C mediado pelo NAc) e teste (aprendizado lento do tipo E-R mediado pelo DLS), mas também aumento de falhas de fuga com administração de sulpiride (100 mg/Kg) e quimpirole na maior dose pré-sináptica (0,1 mg/Kg) na sessão treino. A ausência de respostas a estímulos ambientais caracteriza o quadro persistente de apatia observado em diversos pacientes esquizofrênicos mesmo após o tratamento com antipsicóticos típicos, os quais podem até mesmo levar a pioras deste quadro (Simon et al., 2010; Simpson et al., 2010). Com os dados apresentados neste trabalho, sugere-se que a apatia que aparece como efeito adverso dos antipsicóticos pode ser mediada também por regiões do corpo estriado, principalmente o NAc.

Em situações adversas em que estímulos aversivos são apresentados repetidamente e que não se observa a execução de comportamentos direcionados a evitá-los ou finalizá-los, seria razoável supor que há algum prejuízo na percepção destes estímulos. Entretanto, os dados de latência representados nas tabelas 1 e 2 do artigo apresentado nesta dissertação descartam esta possibilidade, visto que não foi verificada nenhuma diferença significativa na latência de resposta ao choque dos animais que receberam as drogas por via sistêmica ou intra-estriatal em relação aos seus controles. As drogas, neste caso, não afetaram a percepção do US de modo que pudesse fazer com que os animais que as receberam respondessem menos ou

tivessem um atraso para iniciar uma resposta a esse estímulo, o que poderia levar a uma má interpretação dos dados de CAR e falhas de fuga obtidos.

Na tentativa de verificar se a ação de quimpirole e sulpiride sobre o comportamento dos animais na esquiva ativa de duas vias se devia ao seus efeitos especificamente sobre o aprendizado e memória ou simplesmente sobre a performance da tarefa, realizamos infusões imediatamente após a sessão treino destes animais. Mais uma vez observamos a redução de CAR nas administrações pós-treino sistêmica e intra-NAc do agonista e do antagonista, sugerindo um envolvimento do estriado, principalmente do NAc, na consolidação da tarefa, o que fortalece a ideia de que são os processos de aprendizagem e memória da esquiva ativa que são afetados pelos receptores D2, sendo os efeitos observados algo mais do que um simples prejuízo motor. O bloqueio de receptores D2 do NAc prejudicando a consolidação de tarefas de componente aversivo (esquiva inibitória) ou de memória espacial já foi demonstrado por diversos outros estudos (Setlow e McGaugh, 1998; Setlow e McGaugh, 1999; Manago et al., 2009). A administração pós-treino intra-DLS, porém, não apresentou efeitos de redução de CAR. Em geral, testes para verificar a consolidação de um aprendizado utilizam tarefas que podem ser aprendidas em uma única tentativa (McGaugh e Roozendaal, 2009). A tarefa da esquiva ativa é composta por 40 pareamentos CS-US que levam em torno de 30 minutos para serem realizados. É possível que durante este período, à medida que a tarefa é adquirida pelo DLS, o processo de consolidação por parte do NAc (que está livre da influência do agonista ou antagonista D2) já comece a acontecer quase que simultaneamente, o que possibilita a evocação da informação no dia seguinte. Acreditamos que isto seja possível, pois, conforme apontado por Wickens (2007), o estriado dorsal tem uma maior densidade da proteína que faz a recaptação de dopamina das fendas sinápticas (DAT, do inglês *dopamine transporter*) (Wickens et al., 2007). Com isso, após a sua liberação fásica, o *clearance* da dopamina extra-sináptica seria mais acelerado no estriado dorsal do que no NAc. Assim, o acúmulo de dopamina no NAc poderia iniciar a consolidação do aprendizado à medida que o animal aprende a executar a tarefa.

Como mencionado anteriormente, um dos objetivos do estudo foi verificar o papel dos receptores D2 nos processos de aprendizado e memória e no desempenho da esquiva ativa de duas vias. Para isso realizamos infusões sistêmicas e intra-estriatais antes e após o treinamento dos animais. Verificamos que

tanto a aquisição quanto a consolidação desse aprendizado foi comprometida pelas infusões de quimpirole e sulpiride, o que nos levou a supor que, mais do que produzir um prejuízo motor, como muitos autores sugerem (Swanson et al., 1997; Crescimanno et al., 1998; Stuchlick et al., 2007), o bloqueio de receptores D2 têm participação importante na plasticidade sináptica, responsável pelo aprendizado da tarefa. Contudo, considerar o processo de reforço de uma resposta comportamental desvinculado do desempenho motor é complicado, pois a dopamina é importante para ambas as funções (Di Chiara, 2002), visto que ela facilita a escolha de ações motoras previamente reforçadas (Da Cunha et al., 2009). Portanto, torna-se difícil, no mínimo arriscado, dissociar por completo o efeito do bloqueio de receptores D2 por sulpiride no processo de aprendizado e memória, que é evidenciado pela redução de CAR, da atividade locomotora, que é evidenciada pela redução ou aumento de ITC.

5 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados nesta dissertação, é possível concluir que os receptores dopaminérgicos D2 no NAc e no DLS possuem funções diferentes relacionadas ao aprendizado e memória das respostas condicionadas de esquia, sendo o NAc responsável por promover uma adaptação rápida e flexível da resposta a um estímulo aversivo incondicionado ou condicionado, e o DLS responsável por promover uma adaptação lenta e rígida desta resposta.

REFERÊNCIAS

- Alexander, GE; DeLong, MR; Strick, PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 9, p. 357-381, 1986.
- Aguilar, MA; Marí-Sanmillán, MI; Morant-Deusa, JJ; Miñarro, J. Different inhibition of conditioned avoidance response by clozapine and DA D1 and D2 antagonists in male mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 389-400, 2000.
- Balleine, BW; O'Doherty, JP. Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. **Neuropsychopharmacology**, p. 1-22, 2009.
- Balleine, BW; Liljeholm, M; Ostlund, SB. The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. **Behavioral Brain Research**, v. 199, p. 43-52, 2009.
- Balleine, BW ; Delgado, MR. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 8161-8165, 2007.
- Berridge, KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. **Psychopharmacology**, v. 131, p. 391-431, 2007.
- Brischoux, F; Chakraborty, S; Brierley, DI; Ungless, MA. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. **PNAS**, v. 106, p. 4894-4899, 2009.
- Calabresi, P; Picconi, B; Tozzi, A; Di Filippo, M. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 30, p. 211-219, 2007.
- Cepeda, C; Levine, MS. Dopamine and N-Methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. **Developmental Neuroscience**, v. 20, p. 1-18, 2008.
- Crescimanno, G; Emmi, A; Amato, G. Effects of intraaccumbens microinjections of quinpirole on head turning and circling movement in the rat. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 60, p. 829-834, 1998.
- Da Cunha, C; Wietzikoski, EC; Dombrowski, P; Bortolanza, M; Santos, LM; Boschen, SL; Miyoshi, E. Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. **Behavioural Brain Research**, v. 199, p. 157-170, 2009.
- DeLong, MR; Wichmann, T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. **Archives of Neurology**, v. 64, p. 20-24, 2007.
- Dias, FRC; Carey, RJ; Carrera, MP. Apomorphine-induced context-specific behavioural sensitization is prevented by the D1 antagonist SCH 23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the D2 antagonist sulpiride. **Psychopharmacology**, v. 209, p. 137-151, 2009.

Di Chiara, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. **Behavioural Brain Research**, v. 137, p. 75-114, 2002.

Di Filippo, M; Picconi, B; Tantucci, M; Ghiglieri, V; Bagetta, V; Sgobio, C; Tozzi, A; Parnetti, L; Calabresi, P. Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 199, p. 108-118, 2009.

Domjan, M; Burkhard, B. **The principles of learning and behavior**. Brooks/Cole Publishing Company, California, 1982.

Eichenbaum, H. **Learning & Memory**. Norton & Company, New York/London, 2008.

Flaherty, AW; Graybiel, AM. Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system-projections from physiologically mapped body part representations. **J. Neurophysiology**, v. 66, p. 1249-1263, 1991.

Fiorillo, CD; Tobler, PN; Schultz, W. Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. **Science**, v. 299, p. 1898-1902, 2003.

Frank, MJ; Hutchinson, K. Genetic contributions to avoidance-based decisions: striatal D2 receptor polymorphisms. **Neuroscience**, v. 164, p. 131-140, 2009

Grace, AA; Bunney, BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. **J. Neuroscience**, v. 4, p. 2866-2876, 1984a.

Grace, AA; Bunney, BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. **J. Neuroscience**, v. 4, p. 2877-2890, 1984b.

Heinz, A; Schlagenhauf, F. Dopaminergic dysfunction in schizophrenia: salience attribution revisited. **Schizophrenia bulletin**, v. 36, p. 472-485, 2010.

Hooper, KC; Banks, DA; Stordhal, LJ; White, IM; Rebec, GV. Quinpirole inhibits striatal and excites pallidal neurons in freely moving rats. **Neuroscience letters**, v. 237, p. 69-72, 1997.

Horvitz, JC. Stimulus-response and response-outcome learning mechanisms in the striatum. **Behavioural Brain Research**, v. 199, p. 129-140, 2009.

Howes, OD; Kapur, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III – the final common pathway. **Schizophrenia bulletin**, v. 35, p. 549-562, 2009.

Karam, CS; Ballon, JS; Bivens, NM; Freyberg, Z; Girgis, RR; Lizardi-Ortiz, JE; Markx, S; Lieberman, JA; Javitch, JA. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. **Cell**, v. 31, p. 381-390, 2010.

Kram, ML; Kramer, GL; Ronan, PJ; Steciuk, M; Petty, F. Dopamine receptor and learned helplessness in the rat: an autoradiographic study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, p. 639-645, 2002.

Laviolette, SR. Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? **Schizophrenia bulletin**, v. 33, p. 971-981, 2007.

Lekne, S; Tracey, I. A common neurobiology for pain and pleasure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 314-320, 2006.

Lovinger, DM. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 951-961, 2010.

Manago, F; Castellano, C; Oliverio, A; Mele, A; De Leonibus, E. Role of dopamine receptors subtypes, D1-like and D2-like, within the nucleus accumbens subregions, core and shell, on memory consolidation in the one-trial inhibitory avoidance task. **Learning and Memory**, v. 16, p. 46-52, 2009.

Matsumoto, M; Hikosaka, O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. **Nature**, v. 459, p. 838-842, 2009.

McGaugh, JL; Roozendaal, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, p. 3-14, 2009.

Mikell, CB; McKhann, GM; Segal, S; McGovern, RA; Wallenstein, MB; Moore, H. The hippocampus and nucleus accumbens as potential therapeutic targets for neurosurgical intervention in schizophrenia. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 87, p. 256-265, 2009.

Missale, C; Nash, SR; Robinson, SW; Jaber, M; Caron, MG. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 189-225, 1998.

Nader, K; LeDoux, J. The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, p. 152-165, 1999.

Nicola, SM. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 521-550, 2007.

Parent, A; Hazrati, LN. Functional-anatomy of the basal ganglia: The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Res. Rev.**, v. 20, p. 91-127, 1995.

Pavlov, PI. **Conditioned Reflexes**. London: Oxford Univ Press, 1927.

Redgrave, P; Gurney, K; Reynolds, J. What is reinforced by phasic dopamine signals? **Brain Res. Rev.**, v. 58, p. 322-339, 2008.

Schultz, W. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. **Annu Rev Psychol**, v. 57, p. 87-115, 2006.

Schultz, W. Behavioral dopamine signals. **Trends in Neurosciences**, v. 30, p. 203-210, 2007.

Sesack, RS; Grace, AA. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 27-47, 2010.

Setlow, B; McGaugh, JL. Sulpiride infused into the nucleus accumbens posttraining impairs memory of spatial water maze training. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, p. 603-610, 1998.

Setlow, B; McGaugh, JL. Differential effects of immediate posttraining sulpiride microinfusions into the nucleus accumbens shell and core on Morris water maze retention. **Psychobiology**, v. 27, p. 248-255, 1999.

Shumake, J; Gonzalez-Lima, F. Brain systems underlying susceptibility to helplessness and depression. **Behav Cogn Neurosci Rev**, v. 2, p. 198-221, 2003.

Simon, JJ; Biller, A; Walther, S; Roesch-Ely, D; Stippich, C; Weisbrod, M; Kaiser, S. Neural correlates of reward processing in schizophrenia – relationship to apathy and depression. **Schizophrenia Research**, v. 118, p. 154-161, 2010.

Simpson, EH; Kellendonk, C; Kandel, E. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. **Neuron**, v. 65, p. 585-596, 2010.

Squire, LR; Kandel, ER. **Memória: da mente às moléculas**. Artmed, Porto Alegre, 2003.

Stahl, SM. **Psicofarmacologia - bases neurocientíficas e aplicações práticas**. Guanabara, Rio de Janeiro, 2008.

Stuchlick, A; Rehakova, L; Rambousek, L; Svoboda, J; Vales, K. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. **Neuroscience Research**, v. 58, p. 133-139, 2007.

Surmeier, DJ; Ding, J; Day, M; Wang, Z; Shen, W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatum medium spiny neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 30, p. 228-235, 2007.

Swanson, CJ; Heath, S; Stratford, TR; Kelley, AE. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 58, p. 933-945, 1997.

Takamori, K; Yoshida, S; Okuyama, S. Repeated treatment with imipramine, fluvoxamine and tranylcypromine decreases the number of escape failures by activating dopaminergic systems in a rat learned helplessness test. **Life Sci**, v. 69, p. 1919-1926, 2001.

Van Reekum, R; Stuss, DT; Ostrander, L. Apathy: why care? **J. Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 17, p. 7-19, 2005.

Wadenberg, M-LG. Conditioned avoidance response in the development of new antipsychotics. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 358-370, 2010.

Wadenberg, M-L; Hicks, PB. The conditioned avoidance response test re-evaluated: is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics? **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 23, p. 851-862, 1999.

Wadenberg, M-L; Ericson, EL; Magnusson, O; Ahlenius, S. Suppression of conditioned avoidance behavior by the local application of (-)sulpiride into the ventral, but not the dorsal striatum of the rat. **Biological Psychiatry**, v. 28, p. 297-307, 1990.

Wang, WF; Lei, YP; Tseng, T; Hsu, WY; Wang, CF; Hsu, CC; Ho, YJ. Effect of apomorphine on the expression of learned helplessness behavior. **Clin J Physiol**, v. 30, p. 63-68, 2007.

Wickens, JR. Synaptic plasticity in the basal ganglia. **Behavioural Brain Research**, v. 199, p. 119-128, 2009.

Wickens, JR; Arbuthnott, GW. Simulation of GABA function in the basal ganglia: computational models of GABAergic mechanisms in basal ganglia function. **Progress in Brain Research**, v. 160, p. 313-329, 2007.

Wise, SP. The role of the basal ganglia in procedural memory. **Seminars in neurosciences**, v. 8, p. 39-46, 1996.

Yin, HH; Knowlton, BJ. The role of the basal ganglia in habit formation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 464-476, 2006.

Zhang, L; Doyon, WM; Clark, JJ; Phillips, PEM; Dani, JA. Controls of tonic and phasic dopamine transmission in the dorsal and ventral striatum. **Molecular Pharmacology**, v. 76, p. 396-404, 2009.